



Открывая второе измерение,
авторы Пэт Сандра (Pat
Sandra) и Герд Ванхоенакер
(Gerd Vanhoenacker)

4

Комплексный анализ 2D-ЖХ
китайских фитопрепаратов

11

Анализ 2D-ЖХ на службе
фармацевтики, автор
Кападакам Дж. Венкатрамани
(Cadarakam J. Venkatramani)

16

Популяризуя анализ 2D-
ЖХ, авторы Майкл Фрэнк
(Michael Frank) и Дженс
Трафковски (Jens Trafkowski)

25

Проливая свет на двумерную жидкостную хроматографию

Двумерная жидкостная хроматография (2D-ЖХ) больше не является ненадежной узкоспециализированной методикой; прогресс в области оборудования упростил ее и расширил область применения. На страницах этого руководства несколько гуру многомерного анализа и пара молодых специалистов предлагают советы и делятся опытом успешного применения метода 2D-ЖХ.

ВЫШЕ ЭФФЕКТИВНОСТЬ БОЛЬШЕ СВОБОДНОГО ВРЕМЕНИ

Новый ВЭЖХ Agilent 1290 Infinity II

Превосходит ожидания. Устанавливает новые стандарты производительности аналитических исследований, приборов и лаборатории. Получите дополнительное время для выполнения важных задач.

Встречайте новое поколение приборов для УВЭЖХ

EfficientUHPLC.agilent.com

На что вы потратите свободное время?
Присоединиться к обсуждению [#EfficientUHPLC](https://twitter.com/EfficientUHPLC).

© Agilent Technologies, Inc. 2014

Введение в анализ 2D-ЖХ и раскрытие тайны



В начале 2014 года компания Agilent Technologies поставила перед нами четкую задачу: показать, какой простой и надежной стала двумерная жидкостная хроматография.

Так появилась на свет статья «Проливая свет на 2D-ЖХ». А еще началось сотрудничество между учеными-аналитиками и компанией Agilent Technologies, и очень плодотворное.

Мы получили огромное удовольствие от работы с несколькими крупнейшими авторитетами области, включающей несколько ключевых областей применения. Пэт Сандра и Герд Ванхоенакер начали со статьи «Открывая второе измерение», которая дает базовые знания по теории и общее представление о методе 2D-ЖХ, позволяющем работать с большим количеством пиков и пробами более сложного комплексного состава. А в статье «Новый метод анализа: 2D-ЖХ» представлены двое ученых, которые лишь недавно открыли для себя второе измерение и открыто делятся своим опытом. Среди других авторов — Кападакам Дж. Венкатрамани из компании Genentech и Оливер Шмитц из университета Дуисберг-Эссен.

Чтобы окончательно разъяснить вопрос, два других автора — Коэн Сандра и Дуайт Столл — недавно провели вебинар, дающий более полное представление о некоторых практических аспектах метода 2D-ЖХ и ответили на вопросы в режиме онлайн. Доступ к версии по запросу можно получить по адресу: tas.txp.to/1114/2DLCwebinar

И представители компании Agilent, и ученые-аналитики считают это краткое руководство началом обсуждения анализа 2D-ЖХ, а не концом. Мы с нетерпением ждем вопросов и комментариев.

Рич Уитворт (Rich Whitworth)

Редактор

Содержание

- 4 *Открывая второе измерение*
Авторы Пэт Сандра (Pat Sandra) и Герд Ванхоенакер (Gerd Vanhoenacker)
- 4 *Метод 2D-ЖХ и я*
Интервью с Дуайтом Столлом (Dwight Stoll)
- 8 *Исследуя китайские фитопрепараты методом 2D-ЖХ*
Авторы Оливер Шмитц (Oliver Schmitz) и Дуксин Ли (Duxin Li)
- 11 *Решение: Комплексный анализ методом 2D-ЖХ китайских фитопрепаратов*
- 12 *Двумерный биоанализ*
Авторы Коэн Сандра (Koen Sandra), Герд Ванхоенакер (Gerd Vanhoenacker) и Пэт Сандра (Pat Sandra)
- 15 *Анализ гидролизатов моноклональных антител с помощью системы Agilent 1290 Infinity 2D-LC.*
- 16 *Анализ 2D-ЖХ на службе фармакологии*
Автор Кападакам Дж. Венкатрамани (Cadarakam J. Venkatramani)
- 19 *Решение: Ахирально-хиральный анализ методом 2D-ЖХ с переносом неразделенных пиков: анализ хиральных фармацевтических препаратов*
- 20 *Новички метода 2D-ЖХ* Интервью с Берндом Каммерером (Bernd Kammerer) и Олом Гроном (Ole Gron)
- 23 *Решение: 2D-ЖХ в режиме онлайн*
Анализ сложных N-гликанов из биопрепаратов
- 25 *Популяризуя метод 2D-ЖХ*
Интервью с Майклом Фрэнком (Michael Frank) и Дженсом Трафковски (Jens Trafkowski)

Открывая второе измерение

Переход от одномерной к двумерной жидкостной хроматографии — это большой шаг на пути к работе с большим количеством пиков, необходимой для анализа сложных проб.

Авторы Пат Сандра (Pat Sandra) и Герд Ванхоенакер (Gerd Vanhoenacker)

В прошлом эффективность разделения хроматографической системы характеризовалась эффективностью колонки (N). В жидкостной хроматографии эта величина зависит от размера частиц (d_p) и от длины колонки (L). При работе с поверхностно-пористыми частицами $N = L/2d_p$. В 2006 г. были вновь введены в употребление поверхностно-пористые частицы и экспериментальное число тарелок колонки с современным оборудованием достигло $L/1.5d_p$ из-за быстрого массопереноса в тонких пористых оболочках. Кроме того, примерно десятилетие назад технологии производства колонок с поверхностно-пористыми частицами размером до 2 мкм были значительно усовершенствованы. Наряду с усовершенствованным оборудованием для ЖХ, которое выдерживает

давление до 1200 бар, это открывает новые возможности относительно скорости и разрешения для специалистов, практикующих ЖХ.

Для современного комплексного анализа количество тарелок не является эффективной мерой производительности; лучшей — и давно уже ожидаемой — альтернативой является количество пиков, n_c . Введенная Гиддингсом в 1967 году (1), величина n_c обозначает максимальное количество пиков, которое может вместиться при непосредственном прилегании друг к другу между первым и последним значимыми пиками с фиксированным разрешением (обычно 1). Изначально она была введена для изократических разделений; Хорват и Липски (2) были первыми, кто осознал, что значительно большее количество пиков может быть достигнуто градиентным элюированием в ЖХ или программированием температуры в ГХ. Уравнение, обычно используемое для определения количества пиков в градиентном элюировании: $n_c = 1 + t_g/W$ (3), где t_g — время градиентного анализа, а W — средняя ширина пика (4 с).

До ввода оборудования, работающего под высоким давлением, и маленьких частиц, в традиционной ЖХ (1D-ЖХ) может быть получено до 200 пиков. В настоящее время при работе с пористыми частицами размером до 2 мкм (или поверхностно-пористыми частицами) было получено от 570 пиков за 50 минут до 850 пиков за 180 минут (4). Производительность

колонки, выраженная в количестве пиков (пиков/мин), может быть оптимизирована с помощью тонкой настройки времени градиента и (или) потока в зависимости от сложности пробы.

Не стоит, однако, думать, что такое количество пиков является достаточным для разделения очень сложных смесей, которые представляют собой биологические, пищевые пробы, а также пробы из окружающей среды и пробы натуральных продуктов. Количество пиков должно существенно превосходить количество компонентов в пробе; статистическая теория наложения пиков (5) свидетельствует о том, что разделение пиков существенно ухудшается, когда количество компонентов, присутствующих в пробе, превышает 37% количества пиков. И действительно, для разделения 98% случайным образом распределенных компонентов пробы количество пиков должно превышать количество компонентов в 100 раз (6). Это означает, что для «хроматографического» разрешения пробы, содержащей 100 компонентов, необходима величина n_c , равная 10000 (что теоретически соответствует примерно 1×10^8)! К счастью, не одна только хроматография раскрывает сложность пробы; селективная способность современных масс-спектрометров (МС) существенно снижает необходимость разделения во многих областях применения. Однако даже при работе с самыми мощными



Анализ методом 2D-ЖХ и я

Дуайт Столл работал над анализом 2D-ЖХ с 2000 г. Здесь он рассказывает о преимуществах базовой технологии его исследований.

Как Вы начали заниматься методом 2D-ЖХ и почему?

В 2000 году я сотрудничал с Питером Карром, который активно работал над повышением скорости разделений ВЭЖХ. Мы решили применить наши знания в области осуществления

быстрых разделений ко второму измерению; нашей целью было сократить время анализа до 30 минут вместо 5–10 часов без потери производительности.

Каким был тогда метод 2D-ЖХ?

Почти все создавали свои собственные системы и разрабатывали программное обеспечение. Исторически недоступность надежных систем 2D-ЖХ была огромным препятствием, но эта преграда разрушается растущим количеством уже готовых решений, которые вне всяких сомнений изменят восприятие и применение этой мощной методики.

масс-спектрометрами важна изначальная максимизация разрешения, а для лабораторий, проводящих качественные анализы, где часто требуется большое количество пиков, но еще не установлены масс-спектрометры, это чрезвычайно важно. Одним из прямых путей к увеличению n_c является многомерная ЖХ, особенно двумерная, или 2D-ЖХ.

Проливая свет на 2D-ЖХ

Метод 2D-ЖХ в режиме онлайн можно разделить на технологию переноса неразделенных пиков и комплексный подход (см. «Основы 2D-ЖХ»). Перенос неразделенных пиков обеспечивает разделение компонентов в пределах выбранного интервала времени удерживания, тогда как при 2D-ЖХ (обращая на это Ваше внимание) проба целиком подвергается двум разделениям. Фактически первый пример комплексной хроматографии появился 70 лет назад — речь идет о разделении аминокислот посредством хроматографии на бумаге (ХБ) (7): после прохождения по одному фронту растворителя А полоску бумаги поворачивали на 90 градусов и повторно проявляли растворителем В. Учитывая статическую природу ХБ, все было очень просто.

В комплексном анализе 2D-ЖХ две колонки соединяются в серию посредством клапана переключения (модулятора), и фракции небольшого объема из элюата первой колонки



Рис. 1. График сочетания обращенно-фазовой жидкостной хроматографии с обращенно-фазовой жидкостной хроматографией, УФ-детектирование при 320 нм. Первая колонка — C18 с градиентом подвижной фазы от 0,1% муравьиной кислоты в воде к метанолу. Вторая колонка — фенил-гексил с градиентом подвижной фазы от 0,1% муравьиной кислоты в воде к ацетонитрилу.

собираются и вводятся во вторую колонку за несколько повторов чередующихся циклов. Стандартный комплексный модулятор 2D-ЖХ представляет собой десятипортовый клапан переключения с двумя накопительными петля-

ми. Введение последующей фракции (петля 2) во вторичную колонку может быть выполнено только тогда, когда предыдущая фракция (петля 1) полностью элюирует из колонки. На время анализа на первой колонке не накладыва-

Расскажите об основных преимуществах.

Три основных преимущества:

- i) Мощностные методики 2D-ЖХ относительно способности разделения и получаемой информации.
- ii) Высокая степень уверенности в данных относительно скрытых пиков — поэтому метод 2D-ЖХ в режиме переноса неразделенных пиков быстро набирает популярность.
- iii) Потенциал для повышения пропускной способности, например, сокращая 30-минутное одномерное разделение до 10 минут и восполняя утраченное разделение посредством перехода ко второму измерению.

С последним пунктом у меня связан особый интерес. Хотя перевод существующих методов может показаться утомительным (в конце концов, все разделения отличаются друг от друга), потенциал будущей разработки методов очевиден. Вместо того, чтобы довольствоваться 30-минутным одномерным анализом, разработку метода можно начать, держа в уме конечную точку, и работать над способностью разделения для повышения эффективности.

Разве метод 2D-ЖХ не является сложным?

На самом деле, даже до того, как приборы стали доступными, метод 2D-ЖХ не был очень сложным, но требовалось время и определенная квалификация для того, что научиться использовать его по максимуму. Специалисты по раз-

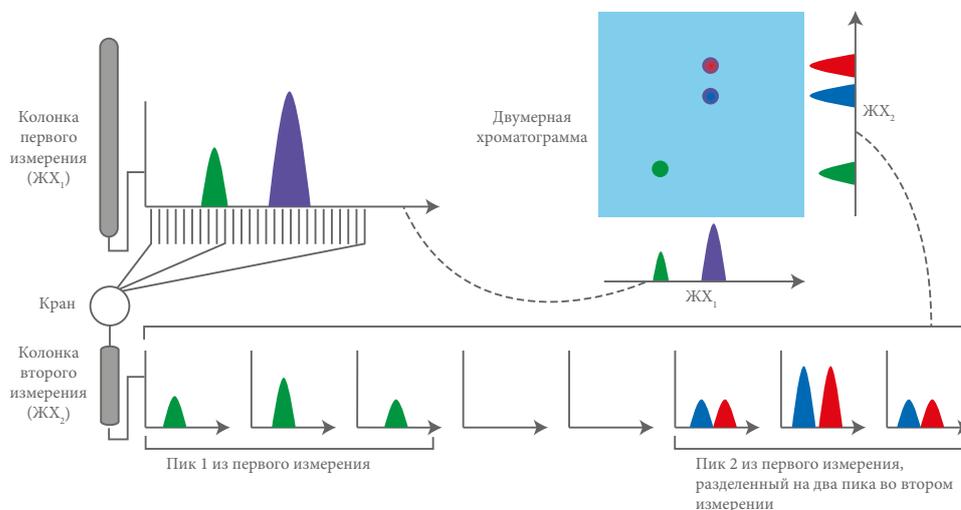
делению в фармакологической и других отраслях промышленности не могут себе позволить терять время.

В значительной степени мы делаем акцент на комплексном анализе методом 2D-ЖХ, который позволяет получить общее представление о составляющих пробы. В последнее время стало легче работать в режиме переноса неразделенных пиков, но, похоже, происходит возрождение — в дело достаточно быстро включается фармакологическая промышленность. Всегда, когда крупные поставщики предлагают технологию, она порождает совершенно новый сегмент сообщества.

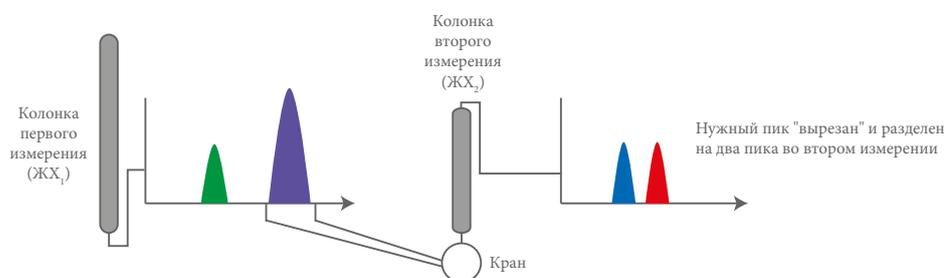
Какие усовершенствования позволили облегчить метод 2D-ЖХ?

Основы 2D-ЖХ

А. Комплексный метод 2D-ЖХ



В. Метод 2D-ЖХ с переносом неразделенных пиков



В комплексном анализе методом 2D-ЖХ весь элюат из первой колонки перемещается во вторую колонку посредством клапана переключения. Клапан перемещает элюат небольшими порциями, которые анализируются с быстрыми градиентами в 20–30 секунд. После сбора данных частичные хроматограммы двух измерений приводятся в соответствие друг с другом. В анализе методом 2D-ЖХ с переносом неразделенных пиков только выбранные части элюата первой колонки перемещаются во вторую колонку. Выделение части пика при разделении позволяет анализировать его на второй колонке с большей эффективностью. Время выполнения анализа второго измерения обычно больше времени сбора из первого измерения.

Невозможность осуществлять очень быстрое градиентное элюирование во втором измерении в прошлом была большой проблемой, но прогресс в технологии насосов позволил перейти от мертвого объема градиента в 1 мл к 100 мкл. Это стало большим прорывом. Время, потраченное на разработку программного обеспечения, также существенно облегчило работу пользователей.

В какой момент метод 2D-ЖХ становится методикой по умолчанию?

Десять лет назад мне (так же, как и многим другим) было ясно, что метод 2D-ЖХ достаточно сложен, и если он не обладает существенно большей производительностью по сравнению с одномерным анализом, то прикладываемые усилия не будут оправданы. Теперь, благодаря моделированию и экспериментам, нам известно, что «переходный период» — время выполнения разделения, при котором двумерный анализ превосходит одномерный — составляет около 10–15 минут (1). Это дало нам серьезную мотивацию для продолжения работы в этом на-

правлении; существует множество потенциальных областей применения, где можно получить значительно лучшее разделение за то же время анализа.

Мы находимся на грани внедрения метода 2D-ЖХ?

Возрастающая осведомленность, доступность поставок приборных комплексов и возникающее осознание того, что мы дошли до границы применения одномерного анализа — все это делает двумерный анализ более привлекательным. Я недавно получил письмо из большой фармацевтической компании, в котором говорилось:

вается никаких ограничений, но время анализа на второй колонке (включая время регенерации после градиента) должно быть не больше периода модуляции. В идеальной комбинации комплексного анализа методом 2D-ЖХ общее количество пиков равно количеству пиков на первой колонке, умноженному на количество пиков на второй колонке: $n_t = n_1 \times n_2$. Теоретически это означает, что при сочетании колонки с $n_1 = 500$ (высокое разрешение) с колонкой с $n_2 = 20$ (высокая скорость) $n_t = 10,000$. Однако экспериментальное значение n_t ниже теоретического, так как пространство 2D никогда полностью не заполняется. Обратите внимание, что в комплексном анализе методом 2D-ЖХ общее время анализа лишь немного больше (обычно 1 мин), чем время анализа на первой колонке.

Оптимальное заполнение пространства 2D происходит, когда механизмы разделения двух измерений имеют явные профили удерживания. Чем выше ортогональность, тем ближе мы к теоретическому количеству пиков. Среди примеров высокой ортогональности сочетание ЖХ с нормальными фазами с обращенно-фазовой ЖХ; хроматографии гидрофильных взаимодействий с обращенно-фазовой ЖХ; эксклюзионной хроматографии с обращенно-фазовой ЖХ; и даже сверхкритической флюидной хроматографии с обращенно-фазовой ЖХ. Как ни странно, хотя сочетание обращенно-фазовой ЖХ с обращенно-фазовой

ЖХ имеет по определению низкую ортогональность, оно дает интересные возможности для различных областей применения, таких как пептидный анализ при различных уровнях pH в двух измерениях (8). Более того, при таком сочетании несовместимость растворителей не создает проблем, и, как показано на рисунке 1, можно разработать очень надежные методы, применимые при выполнении качественного анализа.

Комплексный анализ методом 2D-ЖХ достиг достаточно высокого уровня для его применения в большом количестве областей, даже в стандартных анализах; это в еще большей степени справедливо при использовании надежных приборов, работающих и в комплексном режиме, и в режиме переноса неразделенных пиков.

Пэт Сандра и Герд Ванхоенакер в Исследовательском институте хроматографии, Кортрейк, Бельгия.

Дополнительная литература

«Комплексный хроматографический анализ в сочетании с масс-спектрометрией», редактор Л. Монделло (L. Mondello), (John Wiley & Sons Hoboken, NJ, США, 2011).

Анализ методом 2D-ЖХ от Agilent Technologies
Методическая информация Agilent Technologies:
tas.txp.to/0314/2D-LC

Литература

1. J. C. Giddings, "Maximum Number of Components Resolvable by Gel Filtration and Other Elution Chromatographic Methods", *Anal. Chem.* 39, 1027-1028 (1967).
2. C. G. Horvath and S.R. Lipsky, "Peak Capacity in Chromatography", *Anal. Chem.* 39, 1893 (1967).
3. U. D. Neue, "Theory of peak capacity in gradient elution", *J. Chromatogr. A* 1079, 153-161 (2005).
4. G. Vanhoenacker et al., Agilent Technologies, Application Note 5990-4031 EN, 2009.
5. J. M. Davis and J. C. Giddings, "Statistical Theory of Component Overlap in Multicomponent Chromatograms", *Anal. Chem.* 55, 418-424 (1983).
6. J. C. Giddings, "Sample Dimensionality: A Predictor of Order-Disorder in Component Peak Distribution in Multidimensional Separation", *J. Chromatogr. A* 703, 3-15 (1995).
7. R. Consden, A. H. Gordon, and A. J. P. Martin, "Qualitative Analysis of Proteins: A Partition Chromatographic Method Using Paper", *Biochem. J.* 38, 224-232 (1944).
8. I. François et al., "Tryptic Digest Analysis by Comprehensive Reversed Phase \times Two Reversed Phase Liquid Chromatography (RP-LC \times 2RP-LC) at Different pHs", *J. Sep. Sci.* 32, 1137-1144 (2009).

«Нам недостаточно одномерного анализа — пожалуйста, помогите нам!» Иначе говоря, когда, например, компания Genentech может связаться, например, с компанией Agilent, сообщив каталожный номер оборудования для 2D-ЖХ, то это в корне меняет дело!

В какой области Вы ожидаете прорыв?

Существуют несколько групп в сообществе анализа полимеров, в которых метод 2D-ЖХ используется уже достаточно долгое время и позволил много добиться. Они определенно заслуживают признания усилий, которые они, вероятно, еще будут продолжать прикладывать.

Я думаю, что теперь биофармацевтическую промышленность, скорее всего, ожидает огромный прорыв, потому что она от этого выиграет больше всего. Кроме того, это хорошая отправная точка, поскольку существенным преимуществом будут знания, почерпнутые в протеомике, где первое разделение выполняется с ионным обменом, а второе — с обращенной фазой. Это очень удачное сочетание. Я слышал, что это прекрасный старт.

Дуйат Столл является доцентом аналитической химии в колледже Густава Адольфа, Миннесота, США.

Литература

1. D. R. Stoll, X. Wang, and P. W. Carr, "Comparison of the Practical Resolving Power of One- and Two-Dimensional High-Performance Liquid Chromatography Analysis of Metabolomic Samples", *Anal. Chem.* 80, 268-278 (2008).

Исследуя китайские фитопрепараты методом 2D-ЖХ

Двумерная жидкостная хроматография определенно впечатляет и дает наглядные изображения, но является ли она необходимой для анализа сложных проб? Здесь мы покажем, что метод 2D-ЖХ обеспечивает не только наглядность, но и содержательность.

Авторы *Оливер Шмитц (Oliver Schmitz)* и *Дуксин Ли (Duxin Li)*

Китайская медицина — это древнее искусство. Наиболее ранние тексты о китайской медицине из ныне существующих относятся к первому веку до нашей эры — Huang Di Nei Jing. Как правило, в ранней китайской медицине несколько растений, в состав каждого из которых входили сотни или даже тысячи компонентов, объединялись в одну лекарственную формулу. В наши дни мало что изменилось — обычная формула китайского фитопрепарата является необычайно сложной. Осуществление контроля за продукцией, сопоставимого с западной медициной, является сложной задачей. Китайские фитопрепараты, привлекли внимание всего мира, что и не удивительно, учитывая непрерывный поиск более эффективных лекарств. Это означает заинтересованность исследователей в химических составляющих китайских трав и происхождении их фармацевтических и терапевтических свойств.

Необходимые разделения

Мы все, наверное, когда-нибудь слышали, что из-за увеличения количества лабораторий с масс-спектрометрией высокого разрешения сама хроматография как метод разделения перед детектированием будет становиться все менее и менее востребованной. Для тех исследователей, которые занимаются не хроматографией, это может прозвучать довольно заманчиво. Однако в действительности в этом утверждении не так много смысла: если все компоненты пробы вводятся в источник ионизации одновременно и большой процент из этих соединений ионизируется, то в таких сложных пробах, как китайские травы, образуется несколько тысяч радикальных катионов. А в источнике ионизации под атмосферным давлением, таком как ESI или APCI, все образовавшиеся катионы могут реагировать или взаимодействовать, причем с каждым из них произойдет примерно 20000 соударений от момента ионизации до начала МС. Результатом является потенциальная ионная супрессия и (или) образование артефактов. Это проблема. А решение? Добавление высокопроизводительной хроматографической системы перед МС! Такое сочетание является (и, возможно, всегда будет) золотым стандартом, даже с масс-спектрометрией высокого разрешения.

Комплексный анализ методом 2D-ЖХ — или ЖХ-ЖХ — обеспечивает разделение высокой производительности, необходимое для сложных проб. И действительно, наша группа специализируется на использовании комплексных методик для анализа трав китайских фитопрепаратов. Более неполярные виды анализируются с помощью ГХ-ГХ-МС, тогда как более полярные — с помощью ЖХ-ЖХ-МС (см. рис. 1).

Конечно, анализ ЖХ-ЖХ, так же, как и любая аналитическая методика, имеет достоинства и недостатки в зависимости от области применения. Для нас недостаток ЖХ-ЖХ по сравнению с одномерным ЖХ можно свести к потенциально более низкой чувствительности при МС-детектировании и более сложной разработке методов (1). Однако достоинства очевидны: большее количество пиков (как отмечено в первой статье на стр. 4) и возможность создавать контурные графики, показывающие интенсивность пиков как функцию времени удерживания в первом и втором измерениях — это прекрасно подходит для анализов по типу отпечатков пальцев.

Смещение в механизме

Итак, как еще можно оптимизировать разделение ЖХ-ЖХ? Ответ на этот вопрос кроется в использовании программирования градиентов (см. рис. 2). Наша система позволяет использовать постоянно смещенный градиент во втором измерении, где используется более узкий диапазон соединений подвижной фазы, чем в программе полного градиента, но постоянно смещается диапазон концентраций в соответствии с удерживанием. Градиент смещения в действительности является сочетанием параллельного градиента и полного градиента; более низкий диапазон концентраций делает возможным удерживание слабо удерживаемых фракций, в то время как более высокий диапазон концентраций является достаточным для элюирования сильно удерживаемых фракций, как например, с параллельным градиентом. Градиент смещения обеспечивает супрессию спектральной полосы, но также снижает вероятность «обертывания», как в случае с полным градиентом.

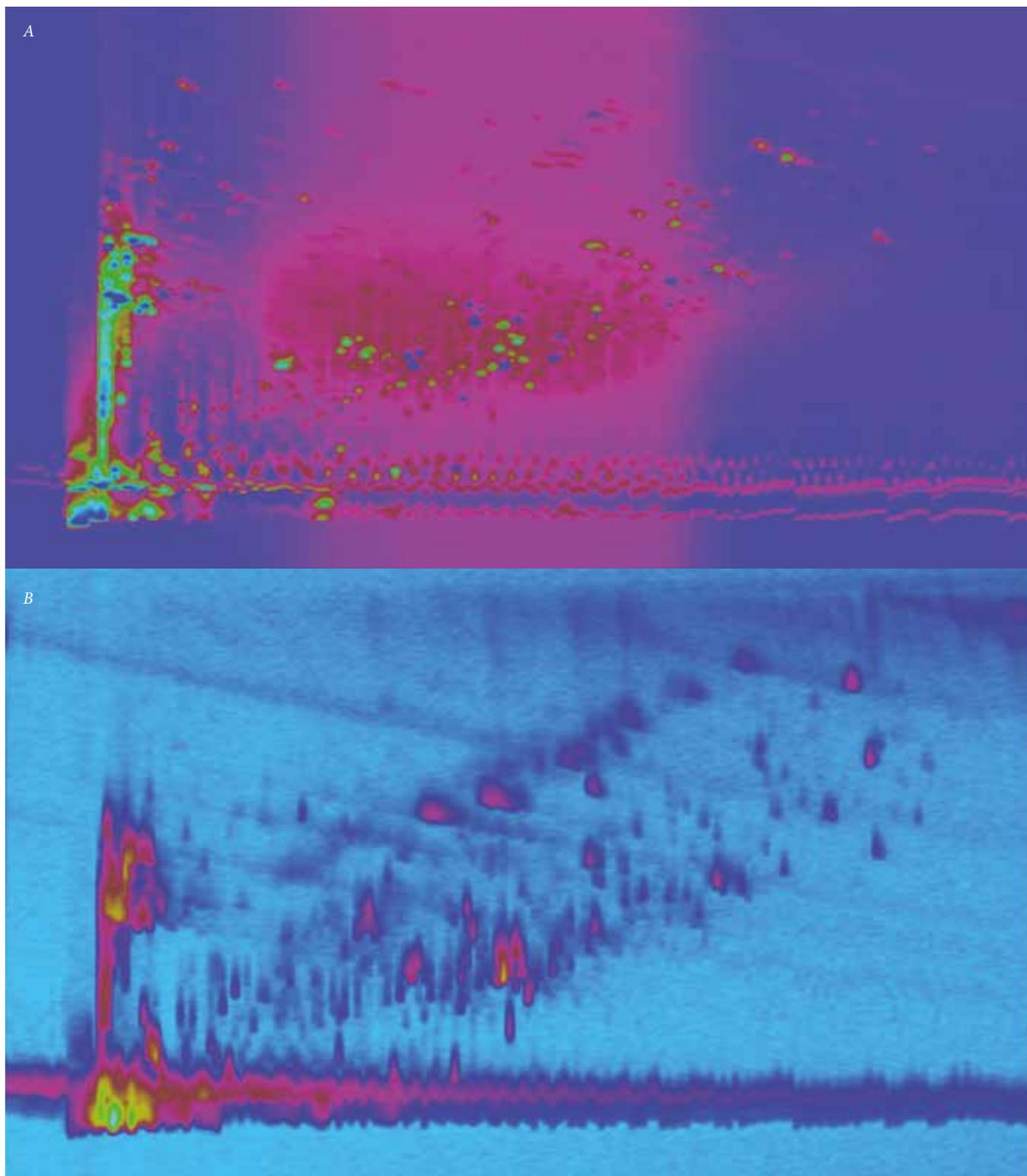


Рис. 1. Анализ методом ЖХ-ЖХ водного экстракта двух трав, *Scutellaria barbata* и *Oldenlandia diffusa* [A: диодно-матричный детектор, B: ЖХ-ЖХ квадрупольно-времяпролетная-МС (Ion Mobility)].

В коррелированной системе сочетания обращенно-фазовой жидкостной хроматографии с обращенно-фазовой жидкостной хроматографии аналиты, рано элюировавшие в первом измерении, будут иметь слабое удерживание во втором измерении; аналиты, элюировавшие в середине первого разделения, будут элюировать в середине второго измерения; и аналиты, поздно элюировавшие в первом измерении, будут иметь сильное удерживание во втором измерении. А поскольку градиент смещения выполняется непрерывно, кластерная информация в реальных пробах сохраняется.

Вне всяких сомнений, градиент смещения существенно увеличивает способность разделения во втором измерении, как показано на рис. 3 и 4 (2).

2D-ЖХ или не 2D-ЖХ — вот в чем вопрос. Следует ли максимально использовать мощь метода 2D-ЖХ? Если требуется повышенное разделение сложных проб, то однозначно да! Анализы нецелевых соединений, такие как идентификация биомаркеров заболеваний, с применением ЖХ-ЖХ-МС стали намного мощнее. И мы только в начале пути. Следующим шагом станет ЖХ-ЖХ-квадрупольно-времяпролетная-МС (Ion Mobility). Первые исследования в этой области выполняются в моей лаборатории прямо сейчас...

Оливер Шмитц является профессором прикладной аналитической химии, а Дуксин Ли является постдоком в университете Дуисберг-Эссен в Германии.

Литература

1. A. P. de la Mata and J. J. Harynuk, "Limits of Detection and Quantification in Comprehensive Multidimensional Separations", *Anal. Chem.* 84, 6646-6653 (2012).
2. D. Li and O. J. Schmitz, "Use of Shift Gradient in the Second Dimension to Improve the Separation Space in Comprehensive Two-dimensional Liquid Chromatography", *Anal. Bioanal. Chem.* 405, 6511-6517 (2013).

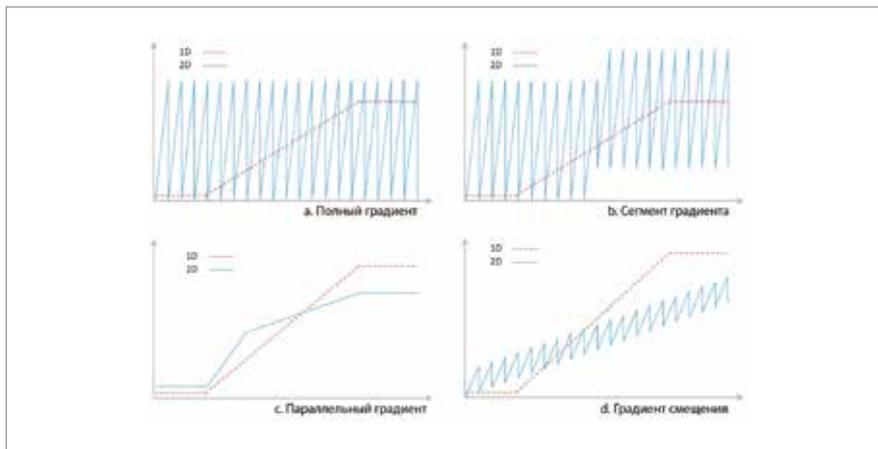


Рис. 2. Графическое представление различных программ градиентов, используемых в 2D-ЖХ

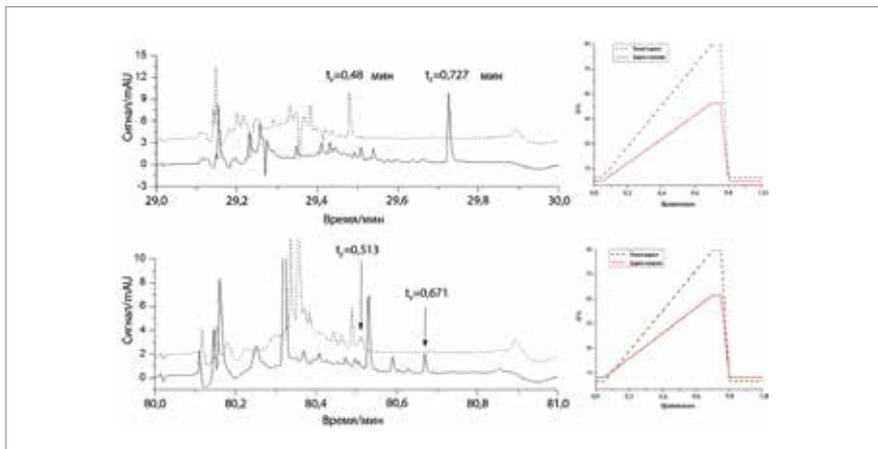


Рис. 3. Сравнение полного градиента (пунктир) и смещенного градиента (сплошная линия) во фракциях 29 (верхняя хроматограмма) и 80 (нижняя хроматограмма) из анализа методом ЖХ-ЖХ водного экстракта двух видов гедиотиса с соответствующими программами градиента справа

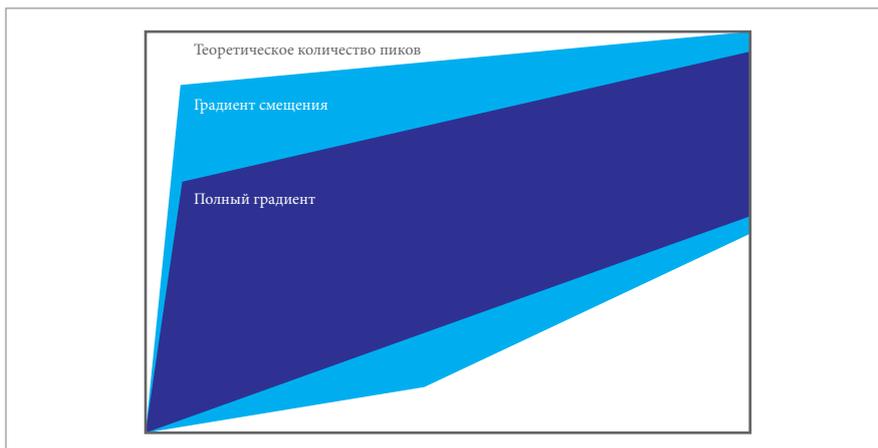


Рис. 4. Сравнение распределения площади пика полного градиента и градиента смещения (из источника литературы 3)

Комплексный анализ методом 2D-ЖХ китайских фитопрепаратов

Достижение высочайшего хроматографического разрешения с помощью системы 2D-ЖХ Agilent 1290 Infinity.

Соня Кригер (Sonja Krieger) и Дженс Трафковски (Jens Trafkowski)

Введение

Китайские фитопрепараты являются одним из аспектов традиционной китайской медицины и могут состоять из одного растительного компонента или из препаратов нескольких растений. Эффективность китайских фитопрепаратов зависит от синергических эффектов нескольких компонентов растений. Растения, используемые в китайских фитопрепаратах, представляют собой пробы чрезвычайно сложного состава. Таким образом, комплексная двумерная жидкостная хроматография (комплексный анализ методом 2D-ЖХ) является предпочтительным методом для их анализа.

Результаты и обсуждение

Для комплексного анализа методом 2D-ЖХ пробы растений были приготовлены в виде отваров. Нет ничего удивительного в том, что отвары трав, используемых в китайских фитопрепаратах, содержат диапазон очень полярных соединений наряду с множеством менее полярных соединений. По этой причине для разделения в первом измерении была выбрана колонка Agilent ZORBAX SB-Aq, так как она удерживает гидрофильные соединения, и анализ может выполняться в 100% водной среде. Кроме того, метанол дает лучшее разделение для ингредиентов веточек шелковицы, так же, как и добавление 0,1% муравьиной кислоты к обоим растворителям. Градиент проводили от 0 до 95% метанола на протяжении 80 минут.

Чтобы выбрать нужную колонку для второго измерения, протестировали несколько

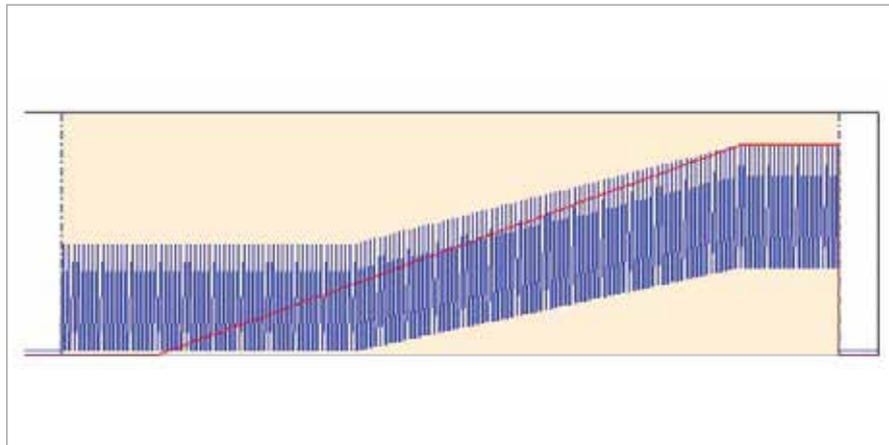


Рис. 1. Сложный градиент, созданный для разделения во втором измерении компонентов отвара веточек шелковицы

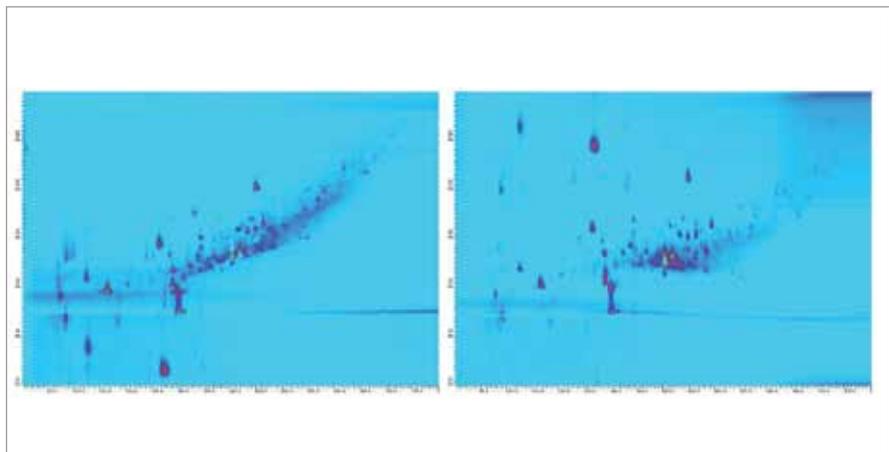


Рис. 2. Комплексный анализ методом 2D-ЖХ отвара веточек шелковицы; (А) — с помощью повтора градиентов второго измерения от 5 до 95% ацетонитрила; (В) — с помощью комплексного градиента второго измерения с детектированием на 254 нм

колонок, при этом колонка Agilent ZORBAX Bonus-RP обеспечила наилучшее разделение для быстрых градиентов. Разность в селективности между разделением первого и второго измерения была достигнута посредством применения ацетонитрила в качестве растворителя и добавления 0,1% муравьиной кислоты к обоим растворителям. Кроме того, более высокая ортогональность обоих измерений, достигаемая за счет ацетонитрила, также является преимуществом из-за создания более низкого обратного давления в сравнении с метанолом. Поэтому во втором измерении могут быть использованы более высокие скорости потока.

Для увеличения доступного двумерного пространства разделения во втором разделении применялся смещенный градиент, как показано на рис. 1. Высокоортогональное разделение показано на рис. 2.

Выводы

Комплексный анализ методом 2D-ЖХ идеально подходит для анализа формул фитопрепаратов, особенно при сочетании двух обращенных фаз в двух измерениях разделения.

Для получения полной информации о решении посетите: tas.txp.to/2DLC/herb

Двумерный биоанализ

Вывод на рынок биопрепаратов и биоаналогов с анализом методом 2D-ЖХ.

Авторы Коэн Сандра (Koen Sandra), Герд Ванхоенакер (Gerd Vanhoenacker) и Пат Сандра (Pat Sandra)

В последние годы список десяти самых хорошо продаваемых препаратов был в значительной степени заполнен белковыми лекарственными препаратами, такими как моноклональные антитела и рекомбинантные белки, которые используются для лечения различных опасных для жизни заболеваний, включая рак и аутоиммунные заболевания. У нескольких очень популярных биопрепаратов в ближайшем будущем истекает срок действия патентов, этот факт спровоцировал всплеск активности на рынке биоаналогов или «биодженериков».

Вне зависимости от того, какая компания разрабатывает инновационные биопрепараты или имитации биоаналогов, должна быть выполнена подробная характеристика. И действительно, необходимо осуществлять очень тщательный мониторинг продукции перед клиническими испытаниями и началом ее выпуска. С учетом того, что сложность состава биопрепаратов белков значительно превосходит препараты с малой молекулярной массой, их характеристика представляет собой сложную аналитическую задачу, для решения которой обычно требуется широкий диапазон аналитических методик и регламентов (1).

Картирование пептидов является широко распространенным регламентом характеристики, поскольку при исследовании оно дает подробное описание молекулы. Например, возьмем моноклональное антитело 150 кДа;

расщепление трипсина даст более 100 пептидов с различными физико-химическими характеристиками в широком динамическом диапазоне концентраций. Сложность этих гидролизатов требует максимальной способности разделения. По сравнению с одномерными разделениями (1D-ЖХ) двумерная ЖХ — и особенно комплексный анализ методом 2D-ЖХ (ЖХ × ЖХ) — существенно увеличивает количество пиков, если два измерения являются ортогональными и разделение, достигнутое в первом измерении, сохраняется при перемещении ко второму измерению.

Ортогональные сочетания для картирования пептидов, основанном на анализе методом 2D-ЖХ, включают сильный катионный обмен и обращенно-фазовую ЖХ (SCX × RPLC); хроматографию гидрофильных взаимодействий и обращенно-фазовую ЖХ (HILIC × RPLC); и обращенно-фазовую ЖХ и обращенно-фазовую ЖХ (RPLC × RPLC) с различными уровнями pH в двух измерениях (2-4). Наивысшая ортогональность достигается при SCX × RPLC и HILIC × RPLC, потому что механизмы разделения совершенно различны. Однако RPLC × RPLC представляет особый интерес; отличная совместимость с растворителем в обоих измерениях делает это сочетание наиболее надежным, но оно дает очень большое количество пиков (благодаря высокому числу тарелок колонки в отдельных измерениях) и отличную ортогональность, связанную с цвиттер-ионной природой пептидов, таким образом основные различия в селективности достигаются при выполнении разделений в обращенно-фазовой жидкостной хроматографии при экстремальных уровнях pH.

На рис. 1 показаны карты триптического пептида анализа методом 2D-ЖХ двух производственных партий моноклонального антитела трастузумаба с помощью RPLC × RPLC. Трастузумаб продавался под названием герцептин с 1998 года и все еще используется в лечении

рака груди с положительным рецептором эпидермального фактора роста (HER 2). Картирование пептидов дает обилие информации, позволяющей определять идентичность и чистоту. Идентичность трастузумаба распространяется на 62 триптических пептида (20 легкой цепи и 42 тяжелой цепи), из которых большинство разделены по базовой линии. Несколько из этих триптических пептидов содержат аминокислоты, подверженные модификациям, таким как дезамидирование, изомеризация, окисление и т. д. Такие связанные с продуктом примеси могут влиять на безопасность и эффективность продукта и нуждаются в мониторинге.

Достоинства технологии 2D-ЖХ относительно таких модификаций представлены на рис. 2, где показан отмасштабированный вид картирования пептидов 2D-ЖХ оригинального продукта, не подвергавшегося воздействию и подвергнутого воздействию pH. Дезамидирование значительно усиливается при воздействии на трастузумаб pH 9 в течение трех дней. Эта модификация, происходящая с аспарагином, находящемся в третьем триптическом пептиде легкой цепи, уже наблюдалась в примерно 10% не подвергавшихся воздействию проб. Идентичность пиков была достигнута с помощью MS, а участки модификации обнаружены с помощью MS-MS.

Воспроизводимость метода RPLC × RPLC в сочетании с УФ-детектированием (время удерживания OCO < 0,2% и область OCO < 5% для n = 5) дает возможность с помощью этого мощного подхода демонстрировать совместимость между производственными партиями, как показано на рис. 1, и между биопрепаратами оригинального продукта и биоаналогами.

Итак, главный вопрос состоит в следующем: на каком этапе процесса разработки биопрепаратов метод 2D-ЖХ дает преимущество? Справедливости ради следует отметить, что на ранних стадиях разработки одномерная ЖХ-МС

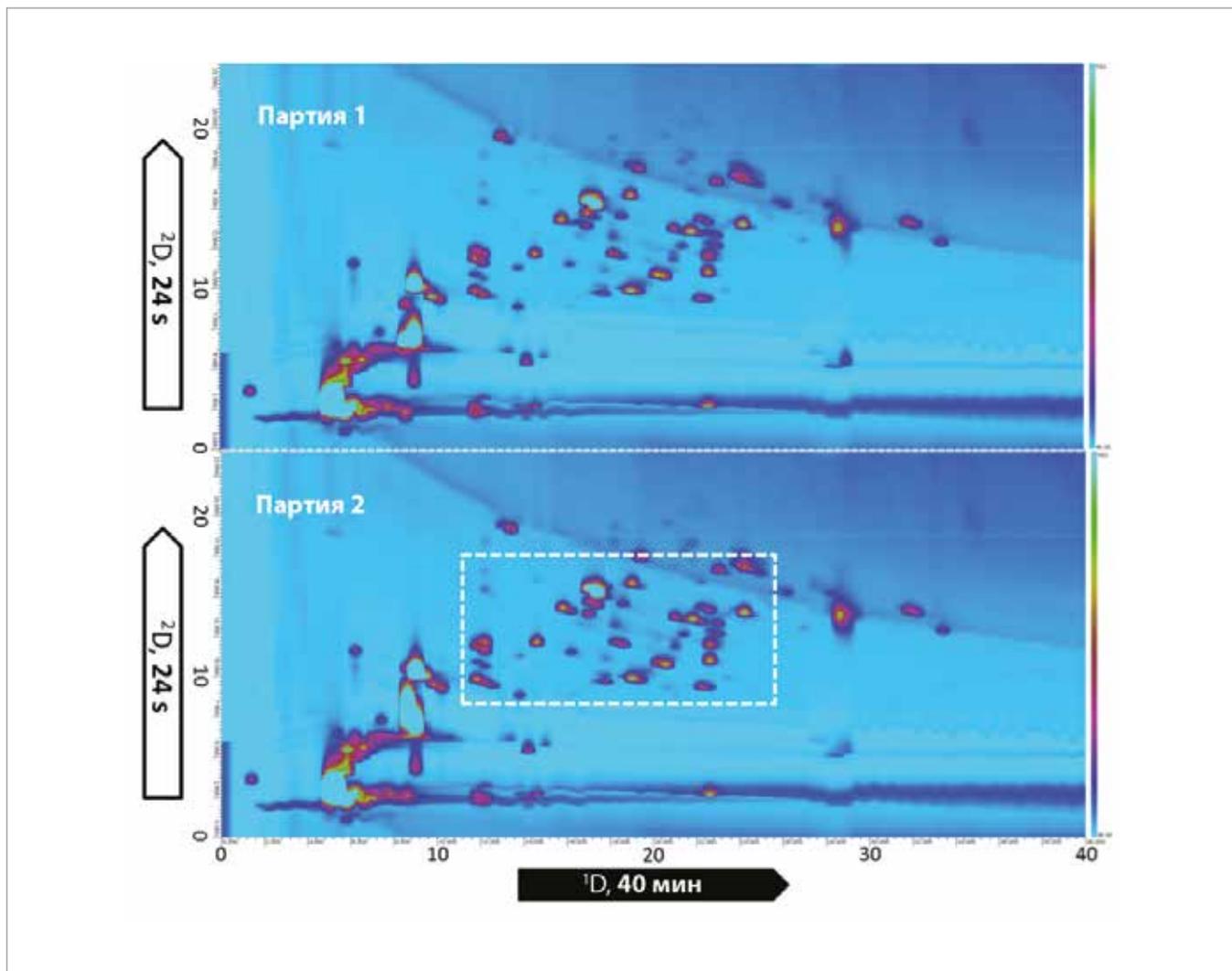


Рис. 1. Карта пептидов 2D-ЖХ двух производственных партий герцептина. Разделение первого и второго измерения состоит из обращенно-фазовой ЖХ, работающей при высоком и низком рН соответственно. Фракции перемещались из одного измерения в другое с помощью клапана с двумя петлями. УФ-детектирование выполнялось при длине волны 214 нм.

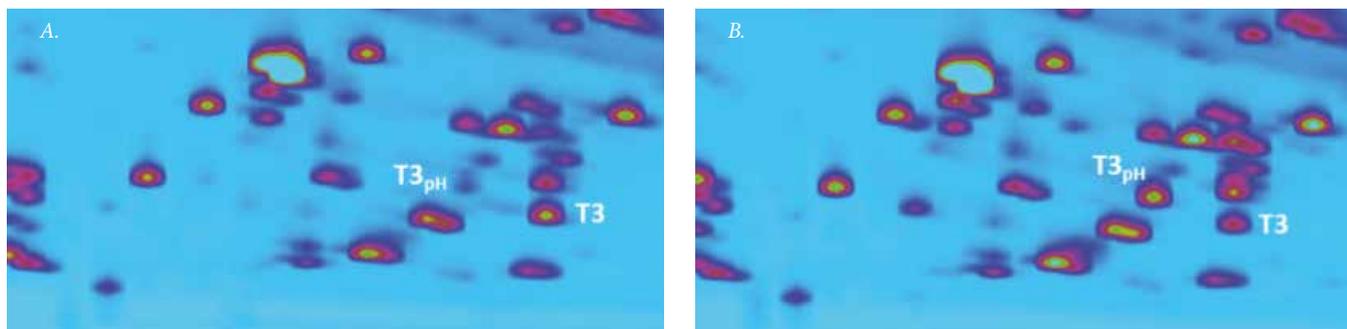
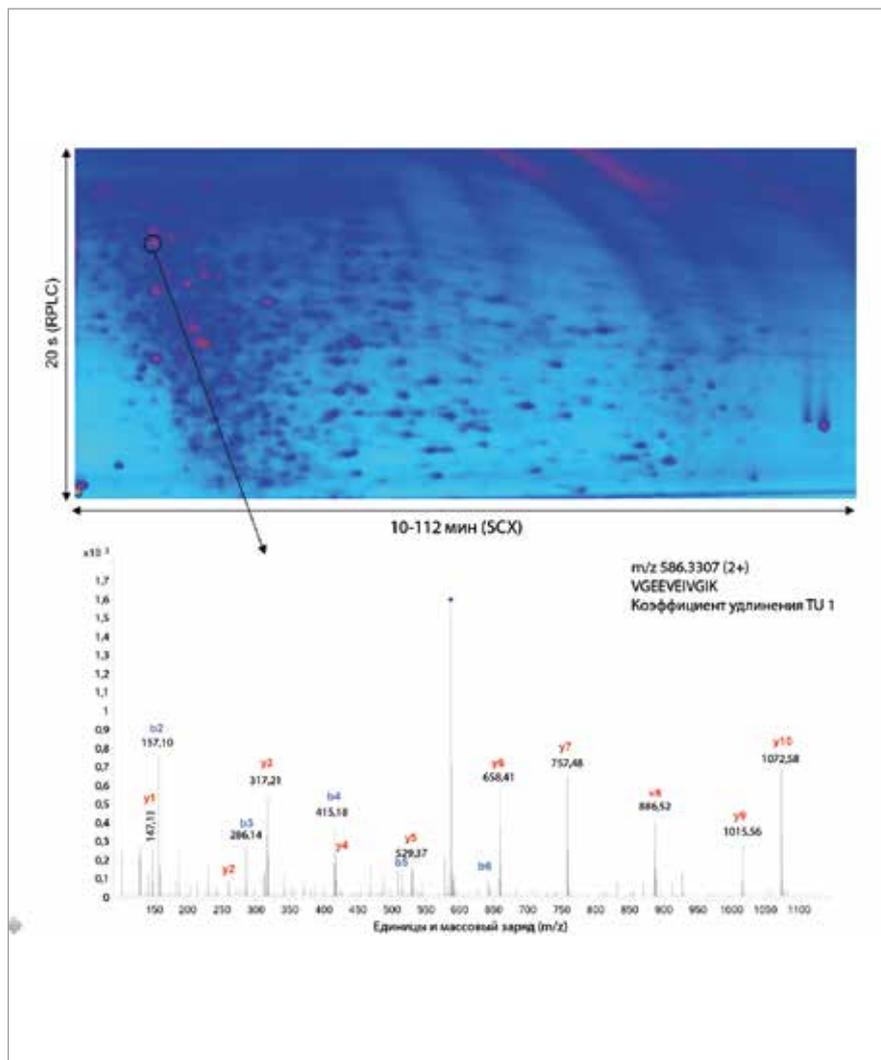


Рис. 2. Масштабированный вид в картах пептидов 2D-ЖХ производственных партий герцептина, не подвергавшегося воздействию (А) и подвергнутого воздействию рН (В), демонстрирующий дезамидирование аспарагина в легкой цепи моноклонального антитела. Т3 относится к третьему триптическому пептиду, считая от N-концевой стороны легкой цепи. Т3_{pH} относится к дезамидированному варианту.

За гранью анализа биопрепаратов: картирование пептидов на основе метода 2D-ЖХ

Авторы Коэн Сандра (Koen Sandra), Герд Ванхоенакер (Gerd Vanhoenacker) и Пэт Сандра (Pat Sandra)

Картирование пептидов на основе метода двумерной жидкостной хроматографии (2D-ЖХ) находит применение за пределами анализа биопрепаратов, что демонстрирует разделение SCX × RPLC триптического гидролизата и общего лизата кишечной палочки. По сравнению с анализом методом 1D-ЖХ существенно увеличивается количество пиков. Высокая ортогональность между двумя измерениями дает замечательное разделение, и переход к системе скоростной квадрупольно-времяпролетной МС позволяет уточнять идентичность пептидов и белков в областях наблюдения.



определенно является хорошим вариантом; колонки обращенно-фазовой жидкостной хроматографии, которые обеспечивают количество пиков значительно больше 500, в настоящее время широко доступны — при использовании в сочетании с масс-спектрометрией высокого разрешения запускается мощный инструмент характеристики. Однако по ходу процесса разработки и по мере перехода к фазам клинических испытаний и начала выпуска продукции, МС желательно заменить УФ-детектированием, и реализуется повышенное разрешение, предлагаемое методом 2D-ЖХ. Вне всяких сомнений, появление на рынке коммерчески

доступного оборудования представляет собой большой шаг к широкому применению метода 2D-ЖХ в анализе биопрепаратов.

Коэн Сандра является директором по научным исследованиям, Герд Ванхоенакер является специалистом и управляющим отделом продукции ЖХ, а Пэт Сандра является основателем и президентом Исследовательского института хроматографии, Кортрейк, Бельгия.

Литература

1. K. Sandra, I. Vandenheede, P. Sandra, *J. Chromatogr. A*, 1335, 81-103 (2014).
2. G. Vanhoenacker, K. Sandra, I. Vandenheede, F. David, P. Sandra, U. Huber, E. Naegele, *Agilent Technologies, Application Note 5991-2880EN* (2013).
3. G. Vanhoenacker, I. Vandenheede, F. David, P. Sandra, K. Sandra, *Anal. Bioanal. Chem., Special Issue "Multidimensional Techniques", in preparation.*
4. K. Sandra, M. Moshir, F. D'hondt, R. Tuytten, K. Verleysen, K. Kas, I. Francois, P. Sandra, *J. Chromatogr. B*, 877, 1019-1039 (2009).

Анализ гидролизатов моноклональных антител с помощью системы Agilent 1290 Infinity 2D-LC

Двумерная жидкостная хроматография: сочетание хроматографии гидрофильных взаимодействий с обращенно-фазовой жидкостной хроматографией — масс-спектрометрией.

Герд Ванхоенакер (Gerd Vanhoenacker), Козен Сандра (Koen Sandra), Изабель Ванденхид (Isabel Vandenheede), Фрэнк Дэвид (Frank David), Пэт Сандра (Pat Sandra) и Удо Хубер (Udo Huber).

Введение

Биопрепараты, такие как терапевтические моноклональные антитела (mAbs) приобретают все большее значение в лечении различных заболеваний. Картирование пептидов является распространенной методикой, применяемой для их комплексной характеристики и определения чистоты. Сложность, связанная с расщеплением моноклональных антител, требует высочайшей мощности разделения. По сравнению с одномерными разделениями комплексная двумерная ЖХ (ЖХ-ЖХ) существенно увеличивает количество пиков.

Результаты и обсуждение

В статье описывается применение методики HILIC-RPLC для анализа триптических гидролизатов трастузумаба с помощью системы Agilent 1290 Infinity 2D-LC в сочетании с системой квадрупольно-времяпролетной ЖХ-МС Agilent 6530 Accurate-Mass Q-TOF. Сочетание хроматографии гидрофильных взаимодействий в первом измерении и обращенно-фазовой жидкостной хроматографии во втором должно обеспечить хорошую ортогональность для таких соединений, как пептиды при постановке метода ЖХ-ЖХ. Эта ортогональность и взаимодополняемость были отмечены в нескольких отчетах, но по большей части при использовании подходов остановки потока или автономной ЖХ-ЖХ. Карта пептидов ЖХ-ЖХ показана на рис. 1. Контурный график был построен по данным полного ионного тока МС. Пятна были определены путем сопоставления экспериментально собранных данных по теоретической последовательности трастузумаба при высокой точности определения массы (< 5 млн д.) с помощью программного обеспечения Agilent MassHunter Bioconfirm. Последующее разделение показало хорошую ортогональность между двумя измерениями.

Применимость разработанного метода оценивалась посредством подвергнутых и не подвергавшихся воздействию проб. Трастузумаб был подвергнут форсированной деградации перед расщеплением. Сравнение данных по пробам, подвергнутым и не подвергавшимся воздействию, позволит определить продукты деградации. На рис. 2 показаны графики выделенных ионов для пептида T41 и его продукта окисления. Из сравнения не подвергавшихся воздействию и окисленных проб видно, что не подвергавшийся воздействию трастузу-



Рис. 1. Контурный график ЖХ-ЖХ для анализа триптического гидролизата трастузумаба

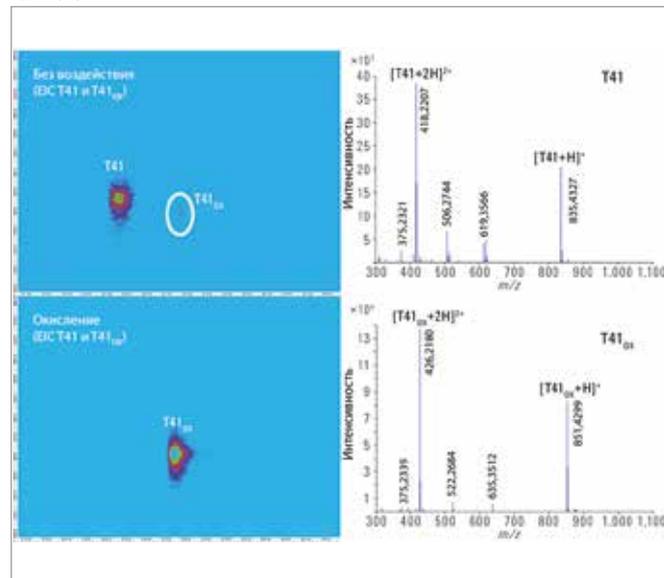


Рис. 2. Контурный график выделенного иона ЖХ-ЖХ для анализа триптического гидролизата, не подвергнутого и подвергнутого окислению трастузумаба

маб уже содержит в небольших количествах окисленный продукт. На вставках на рис. 2 показаны массовые спектры.

Выводы

Система Agilent 1290 Infinity 2D-LC в сочетании с квадрупольно-времяпролетной системой ЖХ-МС Agilent 6530 Accurate-Mass Q-TOF идеально подходит для комплексного анализа гидролизатов моноклональных антител. Возможности ЖХ-ЖХ в сочетании с высокотехнологичным масс-спектрометром для подробного картирования пептидов продемонстрированы характерными результатами по гидролизатам трастузумаба, подвергнутым и не подвергавшимся воздействию.

Для получения полной информации о решении посетите: tas.txp.to/2DLC/antibody

Метод 2D-ЖХ на службе фармакологии

Более 10 лет назад потенциал двумерной жидкостной хроматографии казался мне очевидным — поэтому я создал такую систему и никогда не оглядывался назад. Теперь доработанная версия 2D-ЖХ может играть большую роль в анализе фармацевтических препаратов.

Автор Кападакам Дж. Венкатрамани
(*Cadapakam J. Venkatramani*)

В аспирантуре меня впечатлили поздние исследования профессора Джона Б. Филлипса, который изобрел систему комплексной двумерной газовой хроматографии (ГХ) в начале 1990-х. Мое путешествие в двумерные измерения началось с того, что я присоединился к его группе; меня очень радовала перспектива отобрать пробу после колонки первого измерения во вторичную колонку для дальнейшего разделения с помощью взаимодополняющих фаз. Я посвятил большую часть своих исследований в аспирантуре анализу 2D-ГХ — в частности, разделению проб нефти. Ключевым моментом было разделение более 4000 компонентов пробы нефти с помощью комплексного анализа 2D-ГХ, что в полной мере продемонстрировало потенциал методики (1). В конце 1990-х я устроился на работу в фармацевтическую компанию и решил, что она станет прекрасным местом для расширения концепции метода 2D-ГХ до жидкостной хроматографии (ЖХ). Однако возможность пойти своим путем и двигаться в направлении 2D-ЖХ у меня появилась только в начале 2000-х — вопрос нужного места и нужного времени.

Самодельный метод 2D-ЖХ

Двумерная газовая хроматография работала, поэтому я знал, что заработает и 2D-ЖХ. Главный вопрос состоял в следующем: как создать систему? Тогда не было в продаже готовых 2D-систем, но, к счастью, у нас было несколько систем ВЭЖХ, поэтому оставалось лишь настроить их

и разработать интерфейс 2D-ЖХ для переноса элюата из первичной колонки во вторичную. Короче говоря, я собрал систему с помощью 12-портового 2-позиционного клапана и опубликовал работу в 2003 году (2). В статье делался акцент на несколько различных настроек 2D-ЖХ, включая параллельно соединенные одинарную и двойную колонки во втором измерении, несколько детекторов — помимо всего прочего. Фактически то, чем мы тогда занимались, очень близко к нынешним исследованиям в многомерной ЖХ. Думаю, мы опережали наше время!

Конечно, создать свою собственную систему — непростая задача. Одной из проблем был шум, создаваемый переключением клапана вперед-назад, что усложняло распознавание наложения пиков примесей и шумов ложных всплесков сигнала. Необходимо было полностью синхронизировать время работы клапанов, что было серьезной задачей, учитывая ограничения системы. Мне пришлось интегрировать высокоскоростной электронный таймер, который после запуска автоматически и воспроизводимо запускал переключение последовательности каждые 30, 60 или 90 секунд, согласно требованиям проекта. В общем, мне необходимо было принять во внимание три основных соображения: (i) как настроить две системы ВЭЖХ таким образом, чтобы они могли взаимодействовать, (ii) как успешно взять фракцию из первичной колонки и направить ее в головку вторичной колонки для дальнейшего разделения и (iii) как уменьшить уровень шума базовой линии, создаваемый переключением клапанов. И на тот момент у нас еще не было никаких данных.

Отбирать двумерные данные из системы 2D-ЖХ было столь же сложной задачей. Системы ВЭЖХ давали серии откликов детектора в виде функции времени удерживания первичной колонки. Время удерживания второго измерения было недостающим звеном. Его приходилось вручную воссоздавать в таблице Excel, беря во внимание частоту сбора данных и частоту переключения клапана (3, 4). Двумерный контурный график из смеси проб кислых, основных и нейтральных соединений, разделенный неподвижными фазами смешанного режима в двух измерениях, кислой в первичном и основной во вторичном, показан на рис. 1 (4). Компоненты

пробы разделены на кислую и основную зоны с нейтральными по диагонали. Расположение компонентов пробы в двумерной плоскости отражает ее химическую природу.

Итак, несмотря на сложности, мы все-таки получили отличные данные для демонстрации концепции, поэтому усилия не пропали даром. Как ни странно, мы еще тогда использовали колонки с частицами размером до 2 мкм для некоторых из наших запатентованных неопубликованных работ, не подозревая, что однажды это перерастет в распространенную хроматографическую методику. Мы лишь знали, что для высокоэффективных, высокоскоростных разделений необходимо использовать колонки с небольшим размером частиц (1,8 мкм).

Короче говоря, метод 2D-ЖХ в значительной степени требовал от нас в те годы творческого подхода и напряженной работы, но в свою очередь давал отличные результаты.

Выход метода 2D-ЖХ на новый уровень

Я использовал собственноручно созданную систему до тех пор, пока примерно два года назад компания Agilent не представила собственную модель 2D-ЖХ-МС.

Теперь исследователям, вроде меня, не приходится сталкиваться с многими из наших проблем. Метод 2D-ЖХ стал очень органичным и понятным процессом; он больше не является инструментом исследований в руках нескольких исследователей, а является коммерчески доступным готовым решением с возможностью периодического повторения градиента. Каждый градиент начинается с более высокой прогрессирующей органической силой, чем предыдущий, что повышает эффективность. Ранее мне приходилось использовать поверхностные градиенты в обоих измерениях, но в современных системах программирование повторяющегося градиента является почти безграничным, что открывает совершенно новый диапазон областей применения.

Когда речь идет об анализе фармацевтических препаратов, мы особенно заинтересованы в выделении и определении любых следовых количеств коэлюирующих примесей в основном активном фармацевтическом ингредиенте. Но из-за того что химические соединения, элюиру-

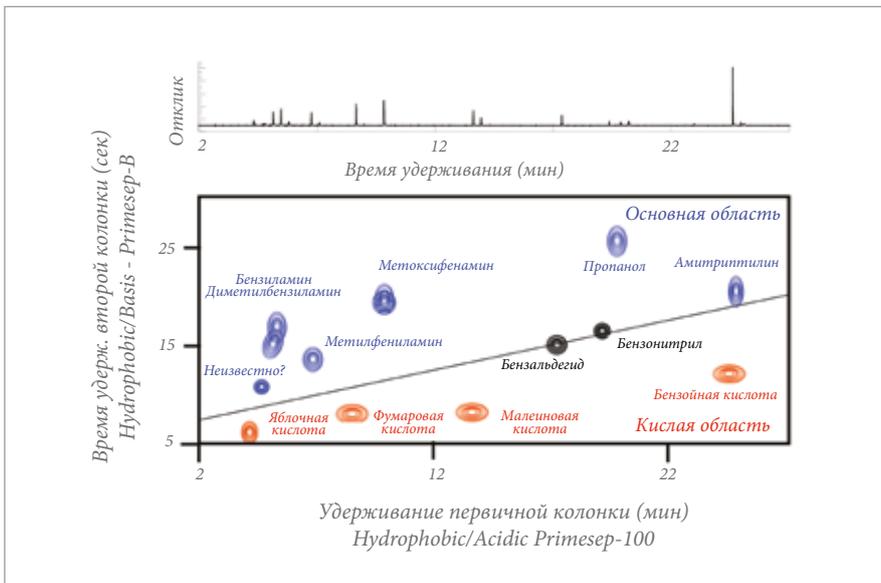


Рис. 1. Дополнительное разделение методом 2D-ЖХ тестовой смеси на колонке Primesep-100 в первичном измерении и на колонке Primesep-B во вторичном измерении. При создании двумерного контурного графика была использована одномерная хроматограмма (сверху). Скорость потока первичной колонки составила 0,5 мл/мин, а вторичной — 3,25 мл/мин. УФ-детектирование проходило при длине волны 215 нм.

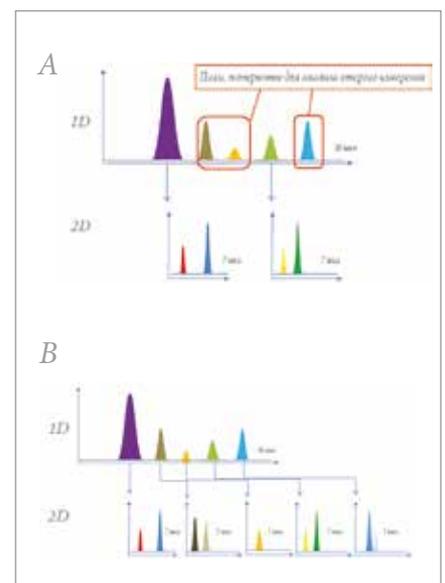


Рис. 2. А. Стандартный метод 2D-ЖХ с переносом неразделенных пиков. В. Метод 2D-ЖХ с системой клапанов-переключателей для многократного переноса неразделенных пиков, что позволяет собирать и хранить фракции в 12 петлях.

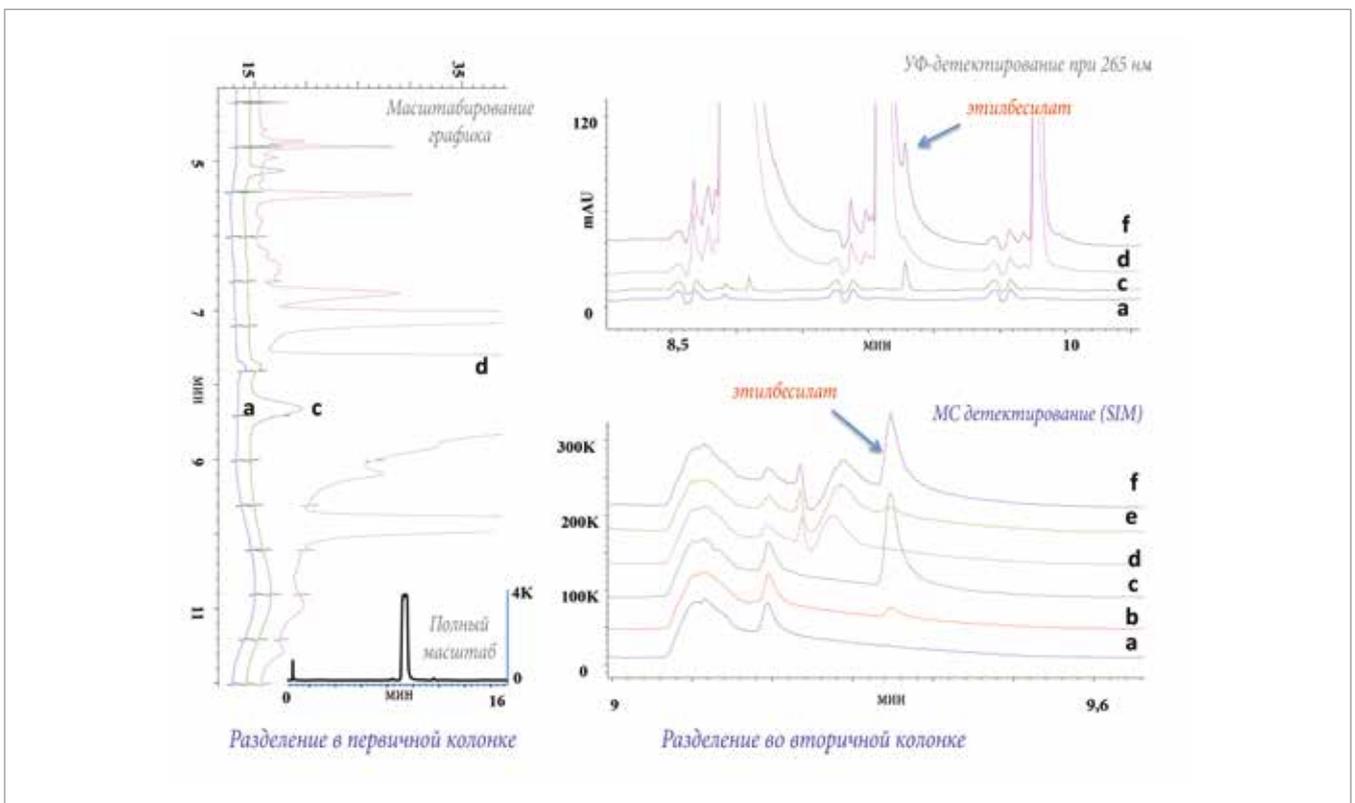


Рис. 3. 2D-ЖХ-МС-разделение этилбесилата, генотоксичной примеси, добавленной в образец активного фармацевтического ингредиента (АФИ). График слева представляет собой разделение на первичной колонке C18 (5 см x 2,1 мм x 1,8 мкм). На вставке представлен полномасштабный график разделения на первичной колонке. На графиках справа представлены разделения на вторичной колонке перемещенных фракций, мониторинг которых осуществлялся с помощью УФ-детектирования при длине волны 265 нм (сверху) и МС-SIM ионной характеристики этилбесилата (M+1 ион, снизу). Во втором измерении использовалась колонка с фенилгексилон (5 см x 2,1 мм x 1,8 мкм).

Этилбесилат частично разделяется во вторичной колонке с УФ-детектированием. МС-данные проб с добавками и без них, расположенные внизу, демонстрируют мощь метода 2D-ЖХ с МС-детектированием. а: разбавленный холостой раствор, б: стандартный раствор этилбесилата 0,5 млн д., с: стандартный раствор этилбесилата 5 млн д., д: АФИ без добавок. е: этилбесилат 0,5 млн д. с добавлением АФИ (10 мг/мл), ф: этилбесилат 5 млн д. с добавлением АФИ (10 мг/мл).

Простые советы для знакомства с 2D-ЖХ

1. *Определитесь с пробой.*
2. *Спросите себя: «Чего я хочу достигнуть? Поможет ли метод 2D-ЖХ решить мою проблему?»*
3. *Просмотрите литературу. Узнайте, что было сделано ранее; не изобретайте велосипед.*
4. *Узнайте, какое оборудование можно приобрести; облегчите себе жизнь.*
5. *Поэкспериментируйте и получите от этого удовольствие.*

ющие вблизи от основного пика, часто похожи по структуре (или являются изомерами), разработка специфичной и чувствительной методики ВЭЖХ может представлять сложность, а традиционные методики детектирования, такие как диодно-матричные детекторы (ДМД) и МС имеют свои ограничения. Кроме того, уровни концентраций этих примесей часто на несколько порядков величины ниже. Это как пытаться смотреть на пик основного компонента размером с высочайшее строение в мире (Бурж Халифа в Дубае), в то же время не желая пропустить примесь размером с пешехода на улице под ним. Благодаря 2D-ЖХ мы получаем второй шанс найти коэлюирующие компоненты с помощью другого механизма разделения во втором измерении. Это большое преимущество для фармацевтической промышленности.

В фармацевтической науке, изучающей небольшие молекулы, анализ примесей, ограниченный пределами вблизи основного компонента, не гарантирует полного выполнения комплексного анализа методом 2D-ЖХ. У нас есть тенденция к применению селективного или псевдокомплексного метода (который является чем-то вроде расширенного переноса неразделенных пиков). В настоящий момент, поскольку мы можем только создавать вторичные хромато-

граммы каждые 30 или 60 секунд, мы замедляем скорость потока первичной колонки (например, от 1 мл/мин до 0,05 мл/мин) по ходу основного пика, что позволяет отправлять больше фракций во вторичную колонку. Недавней инновацией, представленной на ВЭЖХ 2014 компанией Agilent стал приборный комплекс для многократного переноса неразделенных пиков, что позволяет собирать и хранить несколько фракций в 12 петлях, которые затем можно будет последовательно анализировать (см. рис. 2). При его использовании не придется больше замедлять поток в первом измерении. Я думаю, он представляет большую ценность для фармацевтической промышленности. Мы ожидаем получения демонстрационной версии.

Другой пример потенциала метода 2D-ЖХ в фармацевтической промышленности — это доступ к несовместимым методам МС для потенциального коэлюирования. Можно взять небольшую порцию несовместимой с МС подвижной фазы из первичной колонки и ввести во вторичную колонку для дальнейшего разделения, что не повлияет на МС. Я также вижу потенциальное применение 2D-ЖХ в анализе генотоксичных примесей, которые оказывают существенное влияние на здоровье пациентов и подлежат количественному определению даже в очень малых концентрациях. Применение 2D-ЖХ-МС в анализе коэлюирующих генотоксичных примесей показано на рис. 3. Этилбесилат, генотоксичная примесь, коэлюирующая посреди пика АФИ в первичной колонке, частично разделяется во втором измерении с помощью УФ-детектирования. Использование специфичного, чувствительного детектора, такого как МС, позволяет детектировать коэлюирующие примеси, которые отличаются по концентрации на более чем четыре порядка величины, демонстрируя мощь анализа 2D-ЖХ.

Ахиральный/хиральный анализ является еще одной областью, где 2D-ЖХ может играть важнейшую роль, особенно при увеличенном количестве хиральных центров. Мы продемонстрировали доказательство этой концепции в нашей более ранней работе по одновременному ахиральному/хиральному анализу с применением 2D-ЖХ (5).

Я уверен, что в будущем метод 2D-ЖХ будет использоваться для доступа к методам проверки стабильности, для коэлюирования и в качестве механизма получения отзвонков для оптимизации или улучшения стандартных методов. Я думаю, что при использовании метода 2D-ЖХ в качестве инструмента исследования на более ранних стадиях разработки мы сможем создавать более надежные методы проверки стабильности.

Учитывая его достоинства, я не удивлюсь, если метод 2D-ЖХ начнет выходить на центральное место в следующие 5-7 лет — особенно, если регулирующие органы займут более твердую позицию и тщательно изучат аналитические методы проверки стабильности на предмет потенциального коэлюирования.

Кападакам Дж. Венкатрамани является старшим научным сотрудником в отделе фармацевтических исследований малых молекул, Genentech Inc., Сан-Франциско, Калифорния, США

Литература

1. C. J. Venkatramani and J. B. Phillips, "Comprehensive two-dimensional Gas Chromatography Applied to the Analysis of Complex Mixtures", *J. Microcolumn Sep.* 5, 511-519 (1993).
2. C. J. Venkatramani and Y. Zelechok, "An Automated Orthogonal Two-dimensional Liquid Chromatograph", *Anal. Chem.* 75, 3484-3494 (2003).
3. C. J. Venkatramani and A. Patel, "Towards a Comprehensive 2-D-LC-MS Separation", *J. Sep. Sci.* 29, 510-518 (2006).
4. C. J. Venkatramani and Y. Zelechok, "Two-dimensional Liquid Chromatography with Mixed Mode Stationary Phases", *J. Chromatogr. A* 1066, 47-53 (2005).
5. C. J. Venkatramani et al., "Simultaneous, Sequential Quantitative Achiral-Chiral Analysis by Two-dimensional Liquid Chromatography", *J. Sep. Sci.* 35, 1748-1754 (2012).

Ахирально-хиральный анализ 2D-ЖХ с переносом неразделенных пиков: анализ хиральных фармацевтических препаратов

Анализ примесей с одновременным определением энантиомерного состава с помощью системы Agilent 1290 Infinity 2D-LC.

Авторы Соня Крюгер (Sonja Krieger) и Удо Хубер (Udo Huber)

Введение

В соответствии со стандартом Q3A (R2) Международной конференции по гармонизации необходимо сообщать о примесях в новых лекарственных средствах на уровне не менее 0,05% и идентифицировать примеси в количестве не менее 0,1%. Энантиомеры хиральных лекарственных препаратов часто имеют разные фармакокинетические свойства и фармакологическую активность. Один энантиомер может быть фармакологически активным, в то время как другие могут быть неактивными или даже токсичными. Поэтому Управление по санитарному надзору за качеством пищевых продуктов и медикаментов США выпустило руководство по разработке новых стереоизомерных лекарственных препаратов, требующее, чтобы стереоизомерный состав лекарства с хиральным центром был известен и чтобы спецификации на конечный продукт включали свидетельство об отсутствии стереохимических примесей.

Результаты и обсуждение

Анализ примесей, содержащихся в фармацевтических веществах, может быть выполнен посредством жидкостной хроматографии концентрированного раствора вещества. Примеси,

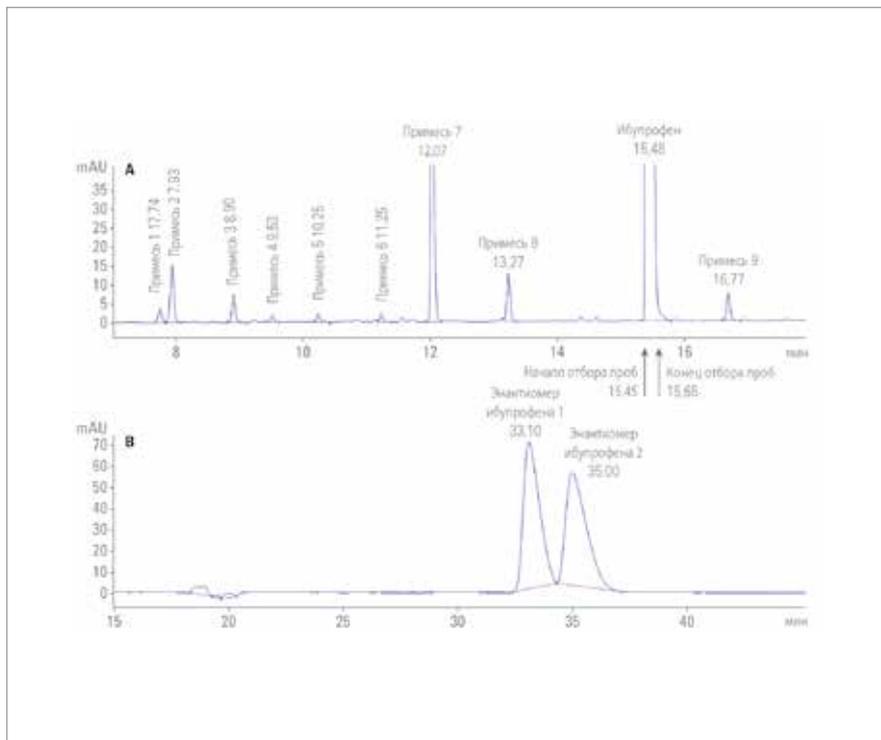


Рис. 1. А. Отделение ибупрофена от примесей 1-9 в первом измерении обращенно-фазовой колонки и В. Перенос неразделенных пиков, соответствующих части хроматографического пика ибупрофена, в хиральную колонку второго измерения для отделения от энантиомеров.

отделенные от фармацевтического вещества, были детектированы в виде небольших пиков рядом с большим пиком основного соединения.

Рацемический ибупрофен был выбран для доказательства принципа анализа примесей в хиральных фармацевтических веществах с одновременным определением энантиомерного состава АФИ. На рис. 1А показана хроматограмма первого измерения обращенно-фазового анализа ибупрофена. Здесь из основного соединения были выделены несколько примесей.

Элюат из колонки первого измерения был отобран в момент 15,45 минуты с временем заполнения петли 0,20 минуты для перемещения пика ибупрофена в хиральную колонку второго измерения, что позволит разделить энантиомеры. На рис. 1 показано извлечение и перемещение элюата из колонки первого измерения в колонку второго измерения (А) и разделение энантиомеров ибупрофена в хиральной колон-

ке второго измерения (В). Энантиомеры ибупрофена были разделены при разрешении $R_s = 1,25$ в хиральной колонке второго измерения.

Выводы

В этой статье показано, что система Agilent 1290 Infinity 2D-LC идеально подходит для анализа примесей хиральных фармацевтических веществ и для одновременного определения энантиомерного состава АФИ. В первом измерении использовалось обращенно-фазовое разделение для отделения ахиральных примесей от АФИ. Эксперимент с переносом неразделенных пиков был использован для перемещения АФИ в хиральную колонку второго измерения для определения энантиомерного состава.

Для получения полной информации о решении посетите: tas.tpx.to/2DLC/chiral



Чего Вы добились на настоящий момент?

Мы только начали использовать новую методику и находимся в процессе оптимизации метода. Выбор подходящего механизма разделения — это первый шаг в разработке метода. Размеры колонки, растворители и градиенты элюции — все это дает возможность улучшить анализ, и различные сочетания материалов колонок дают существенные различия в ортогональности, удерживании и количестве пиков. Наш метод 2D-ЖХ может использоваться в автономной системе ВЭЖХ с диодно-матричным детектором, но его также можно сочетать с различными масс-спектрометрами. Эта высокая степень функциональности и универсальности важна для исследований сложных биохимических соединений.

В настоящий момент мы ожидаем первых комплексных измерений для большой партии используемых на практике проб. Первые результаты выглядят многообещающими (см. рис. 1).

Вы ожидаете более полного применения анализа 2D-ЖХ в метаболомике?

Да. Значимость комплексного метода 2D-ЖХ будет быстро возрастать из-за его универсальности. Я ожидаю, что метод 2D-ЖХ в сочетании с различными источниками ионизации и системами МС станет незаменимым в областях применения аналитической химии, особенно в исследованиях, связанных со сложными матрицами и (или) сложными аналитическими спектрами.

Как Вы намерены использовать метод 2D-ЖХ в ближайшем будущем?

Мы планируем сочетать приборный комплекс нашу систему 2D-ЖХ с различными масс-спектрометрами для работы с широким диапазоном проб и хроматографических задач. Здесь очень важна оптимизация хроматографических методов для определенных текущих задач. В частности, я вижу, что метод 2D-ЖХ открывает новые перспективы для разделения структурных изомеров, что часто происходит в модифицированных нуклеозидах.



Аналитик примесей

Оле Грон работает в фармацевтической промышленности более 10 лет, начиная с того момента, как занялся разделением с помощью спектроскопии. Сейчас Оле работает в филиале научных исследований компании Vertex в Сан-Диего, в отделе аналитических разработок, предлагающем сопровождение от стадии определения круга потребления новых лекарственных препаратов до их клинических испытаний.

Как долго Вы пользуетесь методом 2D-ЖХ? Мы оценивали методику на протяжении двух лет, чтобы понять, стоит ли компании Vertex использовать ее в больших масштабах.

Какая конкретная задача подтолкнула Вас к тому, чтобы обратить внимание на метод 2D-ЖХ?

Честно говоря, когда я впервые услышал о методе 2D-ЖХ, он показался мне интересной новинкой, но я не видел реальной потребности в нем в моей сфере деятельности — в конце концов, мы не страдаем от переполненных хроматограмм, как это бывает в других областях. Однако коммерческое производство заставило нас отнестись к нему более серьезно, поскольку это означало, что мы могли протестировать методику, не тратя время на создание надежной системы. Нашей основной задачей был анализ примесей; хотя наши хроматограммы не были переполнены, у нас могут появиться коэлюирующие примеси с похожими структурами. Мы часто запускаем два отдельных, но ортогональных мето-

да ЖХ для обретения полной уверенности; в принципе, мы хотим видеть по максимуму и в кратчайшие сроки. Нам было интересно, можно ли объединить эти два одномерных анализа в единый метод 2D-ЖХ.

Насколько простым или сложным вам показался метод 2D-ЖХ?

Разумеется, требуется время на обучение — и есть несколько параметров, которые надо обязательно принимать во внимание. Однако стоит только привыкнуть к настройкам — и работа системы станет относительно простой. Что более важно, я чувствую, что могу положиться на коммерчески доступное готовое решение в получении одинаковых результатов раз за разом. Надежность важна.

Как Вы теперь используете свою систему 2D-ЖХ?

Я использовал несколько средних фракций для получения доступа к пику примеси в разделении первого измерения. В настоящий момент я настроил свою систему на хранение каждой примеси с помощью переноса пиков, что удлиняет время анализа во втором измерении.

Как скоро, на Ваш взгляд, метод 2D-ЖХ будет внедрен в фармацевтическую промышленность?

Я не думаю, что стоит ожидать прорыва; фармацевтическая промышленность довольно консервативна, когда речь идет о внедрении новых методик, поэтому это займет время. Однако сложно возвращаться назад, попробовав нечто лучшее. Я оценивал использование метода 2D-ЖХ в нескольких областях применения и могу предположить, что он получит более широкое применение в течение следующего года или двух в компании Vertex.

Если вы тоже новичок метода 2D-ЖХ, то почему бы не поучиться у профессионалов, посмотрев вебинар по запросу, представляемый Коэнном Сандра и Дуйатом Столлом по адресу: tas.txp.to/1114/2DLCwebinar

Множественный перенос неразделенных пиков и комплексный анализ методом 2D-ЖХ в биофармацевтике

Анализ методом 2D-ЖХ в режиме онлайн сложных N-гликанов для высочайшего разрешения с помощью системы Agilent 1290 Infinity 2D-LC.

Соня Шнейдер (Sonja Schneider), Эдгар Негеле (Edgar Naegele), Дженс Трафковски (Jens Trafkowski) и Соня Крюгер (Sonja Krieger)

Введение

Эритропоэтин (ЭПО) представляет собой гликопротеиновый гормон массой 30400 дальтонов (Да), регулирующий выработку красных кровяных телец (эритропоэз). Гликозилирование ЭПО является высоковариативным, поскольку содержит несколько участков гликозилирования, каждый из которых может включать в себя широкий диапазон структур гликана. Это приводит к высокой сложности структур гликана, которая известна как микрогетерогенность. Рекombинантный человеческий ЭПО (рчЭПО) доказал свою высокую эффективность в лечении различных заболеваний, таких как анемия, вызванная раком, хроническая почечная недостаточность и инфекция ВИЧ. Детальная характеристика профиля гликана биопрепаратов является нормативным требованием, поскольку различия в гликозилировании могут повлиять и на фармакодинамические, и на фармакокинетические свойства в человеческом организме. Поэтому необходимо вырабатывать прогрессивные аналитические технологии для эффективного и подробного анализа гликолизации.

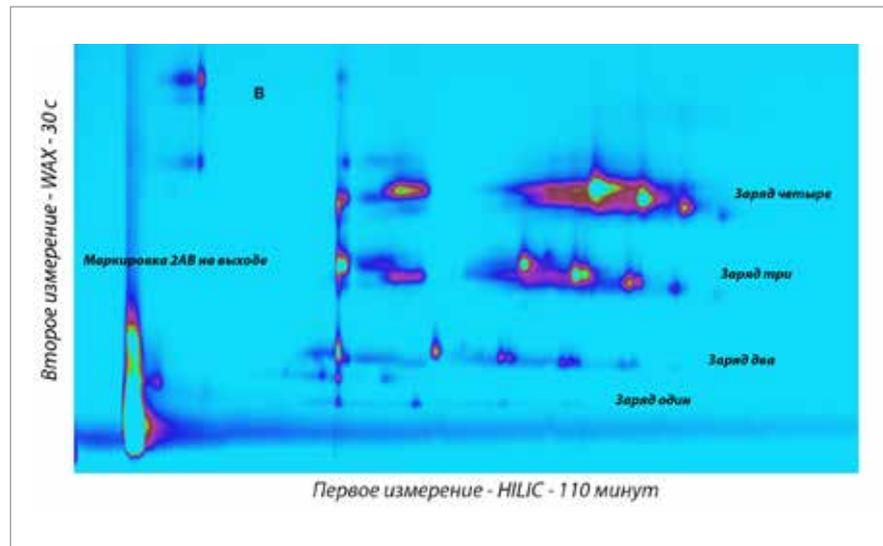


Рис. 1. Комплексное HILIC/WAX 2D-ЖХ-разделение феутина (А) и ЭПО (В), показывающее высокоортогональное разделение. Ионнообменная хроматография во втором измерении показывает профиль зарядов гликанов.

Результаты и обсуждение

Предпочтительным методом для стандартного анализа ВЭЖХ выделенных гликанов обычно является хроматография гидрофильных взаимодействий (HILIC) после маркировки 2-аминобанзамидом (2AB) для чувствительного детектирования на основе флуоресценции. При том, что хроматография гидрофильных взаимодействий эффективно разделяет гликаны в соответствии с гидродинамическим радиусом, ее недостаточно для полного разделения сложной смеси разветвленных структур гликана, присутствующих в таких пробах, как ЭПО. К счастью, слабая/сильная анионнообменная хроматография (WAX/SAX) обеспечивает высокоортогональное разделение, которое зависит от количества и расположения кислых моносахаридов в гликане. Сочетание WAX/SAX и HILIC имеет огромный потенциал относительно увеличения количества пиков в двумерной жидкостной хроматографии (2D-ЖХ) благодаря высокоортогональной природе этих двух методик разделения.

Система Agilent 1290 Infinity 2D-LC обеспечивает протекание процесса 2D-ЖХ в режиме онлайн либо для комплексного анализа, либо для анализа с (многократным) переносом пиков. При комплексном анали-

зе методом 2D-ЖХ с помощью двух петель проб, соединенных посредством 2-позиционного/-4-портового двойного клапана, захватываются все пики из первого измерения. Когда для второго измерения требуется более высокое разрешение, система для переноса неразделенных пиков 2D-ЖХ 1290 Infinity обеспечивает универсальность, например, для применения большего времени цикла или использования более длинных колонок.

Двумерное разделение обеспечивает большее количество пиков и разрешение, и многие коэлюирующие пики из измерения HILIC хорошо разделяются WAX. Разделение второго измерения группирует гликаны по их заряду. Сразу за нейтральными гликанами, элюирующими непосредственно на пике ввода, следуют гликаны с зарядом один. Более четко разделенные, гликаны с зарядом два, три, четыре и несколько с зарядом пять (феутин) элюируют с увеличивающимся солевым градиентом во втором измерении. Изоформы ЭПО классифицируются в соответствии со своим полным зарядом (эпоэтин альфа, бета и т. д.). Такая настройка обеспечивает одновременное профилирование зарядов в сочетании с хорошо разделенной профилем пиков гликана. Идеальная ортогональность обоих механизмов разделения показана на хро-

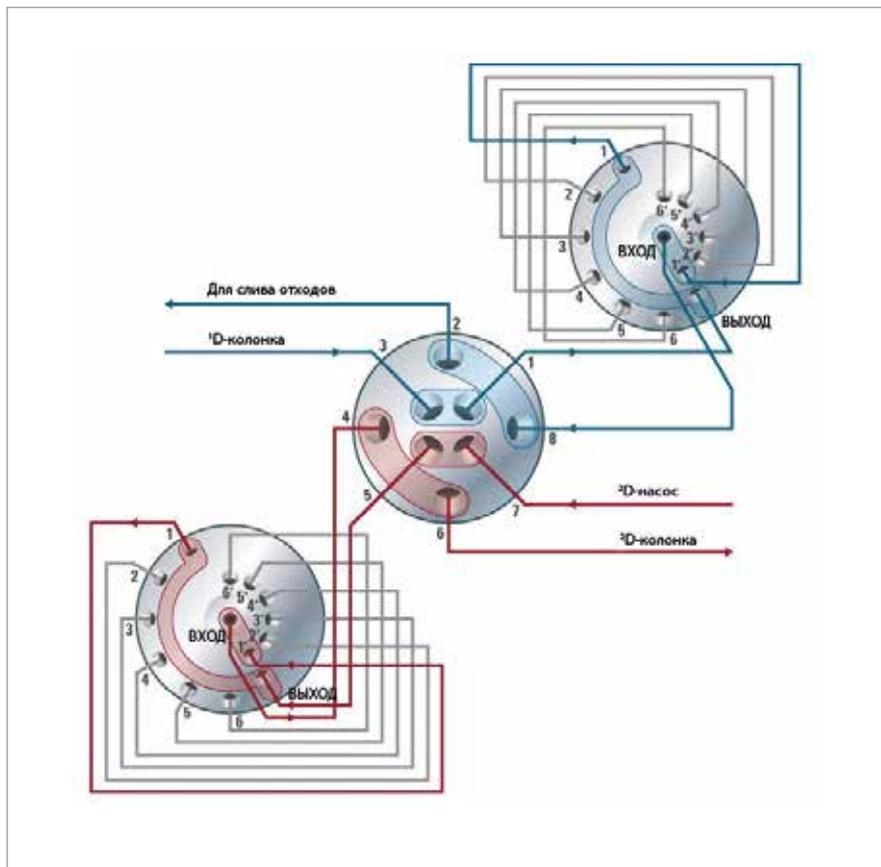


Рис. 2. Схема подключения системы 2-позиционного/-4-портового двойного клапана в сочетании с двумя 6-позиционными/-14-портовыми клапанами с двенадцатью предварительно установленными петлями по 40 мкл

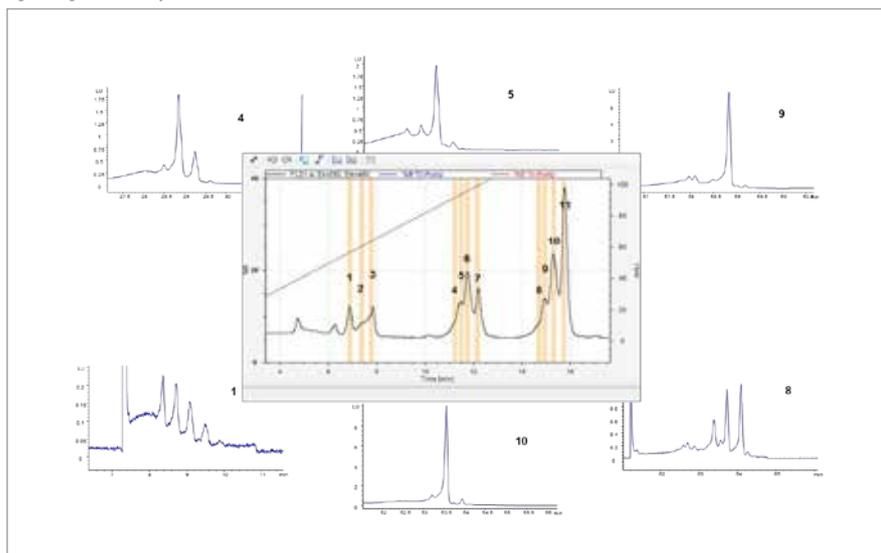


Рис. 3. Шесть примеров высокой разрешающей способности настройки многократного переноса неразделенных пиков, разделение до восьми пиков под областью, отмеченной номером 8

матогамме комплексного анализа методом 2D-ЖХ (рис. 1). Такой подход дает возможность осуществлять скрининг и получать обзор всей пробы, что может быть использовано в идентификации.

Был разработан новый подход 2D-ЖХ с многократным переносом неразделенных пиков для достижения высочайшего разрешения. В этой настройке две петли проб для настройки комплексного анализа 2D-ЖХ заменены на два 6-позиционных/14-портовых клапана переключения колонок, оборудованных шестью петлями проб (рис. 2).

Метод 2D-ЖХ с многократным переносом неразделенных пиков обеспечивает высочайшее разрешение во втором измерении за счет большего времени цикла или колонок. Эта универсальность дает возможность использовать во втором измерении хроматографию гидрофильных взаимодействий для текущей области применений, чего сложно достигнуть в комплексном анализе методом 2D-ЖХ из-за сверхкороткого времени анализа, но более продолжительного периода повторного уравнивания, требуемого для колонок HILIC. При времени градиента 3,5 минуты использовалось повторное уравнивание 1,4 минут. Гликаны удерживались на коротких колонках HILIC, и достигалось хорошее двумерное разрешение (рис. 3). Приведены шесть примеров, демонстрирующих разрешающую способность разделения HILIC в рамках настройки многократного переноса неразделенных пиков (пики 1, 4, 5, 8, 9 и 10). Под большинством пиков, показывающими один большой пик в первом измерении, были детектированы и разделены несколько базовых пиков, например, пик 8 с как минимум восемь пиками во втором измерении.

Выводы

Сочетание комплексного метода и метода 2D-ЖХ с многократным переносом неразделенных пиков, выполненное на одном приборе, дает идеальный инструмент комплексного анализа гликопротеинов.

Для получения полной информации о решении посетите: tas.txp.to/2DLC/glycan

Популяризуя метод 2D-ЖХ

Двумерная жидкостная хроматография не является новой методикой — но только относительно недавно выпускаемые в промышленных масштабах системы добавили удобство использования, надежность и воспроизводимость к значительной способности разделения метода 2D-ЖХ. И какой результат? Метод 2D-ЖХ теперь доступен более широкой аудитории. Здесь Майкл Фрэнк и Дженс Трафковски рассказывают о вкладе компании Agilent в методику и заглядывают в будущее.

Майкл, Вы не могли бы кратко рассказать о стратегии компании Agilent в отношении ЖХ?

Майкл Фрэнк: Компания Agilent Technologies предлагает широкий диапазон аналитических систем ЖХ, чтобы удовлетворить потребности различных потребителей — от стандартных систем до сверхвысокопроизводительных систем для исследователей в области передовых технологий.

Судя по последней части Вашего портфолио, Вы намерены предлагать высочайшую из возможных производительность. Нашей главной задачей является эффективность, причем мы разбили ее на три области: Аналитическая эффективность — необходимо обеспечить клиента наилучшими данными для решения сложных аналитических задач.

Инструментальная эффективность — оператор должен легко взаимодействовать с системой, например быстро создавать новые методы.

Лабораторная эффективность — система должна обеспечивать совместимость с предыдущими версиями, легко интегрироваться в установленное в лаборатории оборудование, позволять снижать общие эксплуатационные расходы и т. д.

Как отмечено выше, важной частью нашей стратегии изначально была совместимость с предыдущими версиями, это означает, что все наши новые системы в первую очередь



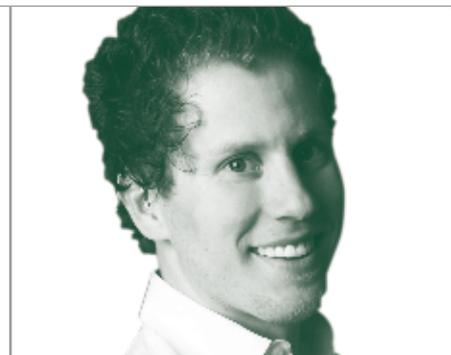
Майкл Фрэнк является старшим директором глобального маркетинга отдела жидкофазной хроматографии, который включает в себя аналитические системы и капиллярный электрофорез. До того, как Майкл пришел в компанию Agilent 10 лет назад, он был директором по аналитике в компании Graffinity Pharmaceuticals (позднее переименованной в Santhera). Изначально он получил квалификацию химика-неорганика в Хайдельбергском Университете и имеет степень доктора химических наук.

должны быть совместимы с предыдущими системами. Мы понесли большие затраты на научные исследования, чтобы выполнить это обещание.

И как это связано с методом 2D-ЖХ?

М. Ф.: На наш взгляд, двумерная ЖХ обеспечивает максимальное количество пиков и высочайшее разрешение — поэтому она не заменяема для анализа проб сложного состава. Есть несколько способов повышения разрешения и увеличения количества пиков. Первый — снижение размера частиц. Эта философия дала нам УВЭЖХ, и мы определенно продвинулись в этой области. Но частицы меньших размеров увеличивают обратное давление системы, и реальный выигрыш в количестве пиков невелик. Когда речь идет о методе 2D-ЖХ, выигрыш измеряется не в процентах, а в двух-трех раз.

Мы много вложили в то, чтобы вывести метод 2D-ЖХ из разряда экспериментальной «самодельной» методики, обращая внимание на надежные промышленные системы, которые могут управляться даже операторами с базовым опытом в ЖХ. Мы запустили 2D-ЖХ в качестве технологии в 2012 году, поэтому мы получили шанс увидеть использование нашей системы в производственных сферах,



Дженс Трафковски является глобальным продукт-менеджером в отделе жидкофазной хроматографии и был назначен ответственным за развитие и продвижение систем Agilent 1290 Infinity 2D-LC в 2012 году. Перед тем, как он пришел работать в компанию Agilent в 2011 году, Дженс получил шестилетний опыт в качестве узкого специалиста, обеспечивающего подготовку персонала и техническую поддержку для систем ЖХ-МС. Дженс получил степень доктора наук в Институте разреженных медицинских препаратов в Бонне, выполнив работу о применении ЖХ-МС-МС в судебно-медицинской токсикологии.

например, в разработке методов в крупных фармацевтических лабораториях — очень далеко от изначального применения в качестве узкоспециальной технологической новинки.

Несколько компаний уже опубликовали научные статьи, описывающие в своей работе метод 2D-ЖХ, — это отличный показатель того, что 2D-ЖХ принята в качестве надежной технологии основного рынка — а это именно то, чего мы добивались.

Дженс Трафковски: Метод 2D-ЖХ прекрасно вписывается в нашу стратегию, поскольку вносит вклад в существующее портфолио, расширяя возможности клиентов по решению сложных задач. За счет полной коммерциализации методики мы можем предложить непревзойденную простоту в использовании и снизить риск возникновения ошибок. А поскольку в прошлом мы провели большой объем работ, создавая методы и протоколы, пользователи могут получить готовые результаты — и тем временем прочитать Справочник по 2D-ЖХ, который мы создали для понимания теории, на которой основана методика. Мы считаем, что такой подход обеспечивает наилучшее введение в методику, которая — стоит ее освоить —

добавляет фантастическую, универсальную и внушительную новую методику в запас аналитических инструментов.

Насколько важно сотрудничество в области разработок?

М. Ф.: Начиная с ранних стадий разработки, мы наслаждались каждой возможностью близкого сотрудничества с несколькими авторитетными экспертами в науке и промышленности. Они внимательно рассмотрели наши системы и внесли прекрасный вклад, что позволило нам увеличить простоту использования и улучшить производительность.

Наш нынешний опыт сотрудничества привел нас от авторитетных экспертов в лаборатории со значительно меньшим опытом многомерных исследований, что является еще одним очень хорошим знаком для нас как для производителя. Начиная с 2012 года мы внесли несколько улучшений, например, недавно мы вывели на рынок несколько систем 2D-ЖХ с многократным переносом неразделенных пиков (см. рис. 2 на стр. 17) в виде полного набора для пользователей — что особенно полезно в фармацевтической промышленности.

Что бы Вы сказали тем, кто имеет ограниченную потребность в методе 2D-ЖХ?

М. Ф.: Это хороший вопрос. Если пользователи в основном хотят пользоваться одномерной ЖХ, но иногда им требуется мощь двумерной, то переключаемая конфигурация 1D – 2D полностью оптимизирует использование приборов, это означает, что система 2D-ЖХ не будет пылиться в углу. Предлагаемая нами универсальность полностью соответствует философии лабораторной эффективности.

У Вас уже есть «Справочник 2D-ЖХ»

(см. задний форзац) — какие еще возможности в области обучения Вы предоставляете своим клиентам?

М. Ф.: Мы проявляли большую активность на конференциях с техническими семинарами, посвященными переобучения по 2D-ЖХ. Но я думаю, что наша быстро расширяющаяся библиотека методических указаний от нас и наших клиентов дает представление не только о том, как работает метод 2D-ЖХ и в каких

областях, но и о том, насколько универсальной может быть методика в зависимости от цели — одно- и многократный перенос неразделенных пиков, комплексный — каждый вид предлагает уникальные преимущества за счет иного использования дополнительного количества пиков. Во многих случаях мы уже разработали решения, которые потребуются потенциальным пользователям 2D-ЖХ.

Дж. Т.: Мы очень хотим, чтобы пользователи получали максимальную производительность от наших систем — ключ к этому в знаниях и образовании. Мой опыт в качестве специалиста позволяет утверждать, что стоит человеку узнать больше о методике и набраться уверенности, то результат будет значительно лучше. Нашей неизменной целью является претворение этого в жизнь.

Каких разработок в области 2D-ЖХ нам следует ожидать в будущем?

М. Ф.: Хотя я не могу полностью раскрывать наши планы на будущее (Я уверен, что наших конкурентов это обрадует!), я определенно могу утверждать, что у нас есть несколько конкретных целей, одна из них — еще максимально облегчить настройку методов 2D-ЖХ. Наша задача — избавиться от всех сложностей, чтобы люди могли без страха приниматься за работу с 2D-ЖХ — как с любым другим методом ЖХ. В этом отношении также важны расширенные возможности анализа данных.

Дж. Т.: Очевидно, что развитие в технической сфере еще не завершено. Здесь есть множество идей и возможностей, некоторые из которых были предложены нашими клиентами. Развитие является — и всегда должно оставаться — непрерывным процессом. Мы являемся лидерами в области технологии и хотим поддерживать этот статус.

В какой области Вы ожидаете прорыв?

М. Ф.: Двумерная ЖХ обретает свое лицо при работе с пробами сложного состава — я не вижу в этом отношении ограничений в области рынка. Например, у нас есть компании, которые пытаются обнаружить аллергены в перерабатываемых пищевых продуктах. Другие находят ей применение в области переработки углеводородов. Биопрепараты связаны с про-

бами сложного состава, ей находится применение и в анализе небольших молекул в области анализа примесей и разработки методов. Сразу видно, что область применения методики очень широка — когда клиенты обретут уверенность и убедятся в успехе в своих областях применения, появятся и другие.

Уже сейчас метод 2D-ЖХ преступил порог первопроходцев и перешел в области применения с высочайшей потребностью в способности разделения. Мы ожидаем, что прорыв метода 2D-ЖХ почти зеркально отобразит историю с УВЭЖХ; десять лет назад УВЭЖХ преимущественно использовалась в отделах научных исследований компаний и образовательных учреждений, но теперь она получила широкое распространение.

Хорошим показателем того, что у метода 2D-ЖХ большое будущее, является тот факт, что другие производители аналитических систем также начали переходить в эту область. Для нас это подтверждение того, что мы приняли верное решение, вложив в технологию на ранних этапах. У нас есть большое преимущество первопроходцев на рынке — и мы не откажемся от него.

Дж. Т.: Определенно, по мере того, как анализ 2D-ЖХ раз за разом доказывает свою состоятельность в различных сферах применения, люди увидят преимущества, и появятся новые сферы применения. Мы не можем все их заранее предвидеть, но я уверен, что они не ограничиваются одной областью. Метод 2D-ЖХ укоренится во многих областях, начиная биоанализом, кончая анализом пищевых продуктов и всем тем, что посередине.

Последнее напутственное слово?

Дж. Т.: Операторы хроматографов не хотят пропустить ни одного пика, но при этом им необходимы надежные, воспроизводимые результаты — именно это мы и предлагаем.

М. Ф.: Тем, кто слышал о методе 2D-ЖХ и имеет некоторую заинтересованность в нем, я скажу: не бойтесь! Это отличный инструмент, который позволит решать аналитические задачи так быстро, как никогда раньше. Лишь один небольшой шаг разделяет одномерную и двумерную жидкостную хроматографию.

Получите бесплатный Справочник 2D-ЖХ

Двумерная жидкостная хроматография

Профессор д-р Питер У. Карр, Миннесотский университет,
Миннеаполис, Миннесота, США

Профессор д-р Дуайт Столл, колледж Густава Адольфа,
Сент-Питер, Миннесота, США.



Доступно весной 2015 г.
Закажите себе копию онлайн
agilent.com/chem/2DLC-Primer

Проливая свет на
двумерную жидкостную
хроматографию



Agilent Technologies

**the
Analytical Scientist**

agilent.com/chem/infinity-2DLC

Номер публикации Agilent 5991-5363RU, напечатано 19 ноября 2014 г.